

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**PROPUESTA DE VALIDACION DEL METODO DE ESPECTROSCOPIA
INFRARROJA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GRASAS TRANS EN
MARGARINA.**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

IRIS YASMIN BLANCO CHAVEZ

CECILIA AYMEE CABALLERO

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING.MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LIC. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORES DE ÁREA DE ANALISIS DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMETICOS

Lic. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

DOCENTE ASESOR

Lic. Henry Alfredo Hernández Contreras

Agradecimientos

Principalmente a Dios y a mi querida Virgencita de Guadalupe por permitirme con su ayuda espiritual superar todos los momentos difíciles y a la vez por brindarme su compañía en todos los momentos más gratos de mi vida.

A mi madre Pedrina por su apoyo y amor que sin ti no lo hubiera logrado, eres el pilar de mi vida, agradezco de todo corazón su amor, cariño, comprensión y apoyo, en todo momento te llevo conmigo mami, te amo profundamente.

A mi tío Saúl por otorgarme su apoyo y cariño, por siempre dejar una huella en mi corazón de bondad y humildad con cada uno de sus detalles.

A Mina por tu apoyo en todo momento, confianza, consejos, paciencia y amor incondicional.

A Fran por todo su apoyo, dedicación y guía durante este proyecto, por el cariño y sus consejos y por ser una motivación y ejemplo profesional a seguir para mi persona.

A Iris gracias por tu amistad, por ese apoyo incondicional y por ser mi compañera en este proyecto, porque a pesar de las turbulencias que se presentaron para el logro de esta investigación salimos adelante.

Finalmente agradezco a nuestro docente asesor, al jurado y a los maestros que nos han apoyado siempre y nos han brindado ese amor por el conocimiento.

Infinitas gracias a todos mis familiares, amigos, amigas y demás personas que indirectamente formaron parte de esta tesis.

“Encomiéndate a Dios de todo corazón, que muchas veces suele llover sus misericordias en el tiempo que están más secas las esperanzas”

(Miguel de Cervantes)

Aymee Caballero

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por ser mi fortaleza en los momentos difíciles, para superar los obstáculos que se me presentaron a lo largo de este proyecto, sé que sin el este logro no sería realidad.

A mis padres por ser los pilares que me han guiado a lo largo de toda mi vida, por haberme brindado su apoyo incondicional que seguiré recibiendo siempre, por sus consejos de seguir adelante ante cualquier adversidad.

A mi abuelita Holanda Espinoza que aunque ya no estas con nosotros siempre fue un gran apoyo a lo largo de mi vida, animándome en todo momento para seguir adelante sé que desde el cielo estarás conmigo en este logro.

A José Ovidio Hernández por tu apoyo incondicional en todo momento, por tus consejos y paciencia.

A mi princesa Iliana Fabiola por ser mi motivo de salir adelante y darme su amor incondicional en todo momento.

Gracias a nuestro docente asesor Lic. Henry Alfredo Hernández Contreras, por su paciencia, por compartir su conocimiento y habernos facilitado siempre los medios para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de este trabajo.

Por ultimo a mi compañera Cecilia Aymee Caballero por su amistad, esfuerzo y paciencia porque hasta aquí Dios nos ha permitido terminar este trabajo, nos ha permitido compartir altos y bajos pero con su ayuda seguimos adelante hasta llegar a la meta final.

Iris Blanco.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 Introducción	xix
CAPÍTULO II	
2.0 Objetivos	22
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	24
3.1 La Margarina	24
3.1.1 Definición	24
3.1.2 Historia	24
3.1.3 Clasificación	25
3.1.4 Composición	25
3.1.5 Componentes de la margarina	27
3.2 Grasas Trans	27
3.2.1 Concepto	27
3.2.2 Formación de ácidos grasos trans	28
3.2.3 Estructura química	28
3.2.4 Como afecta a la salud	29
3.2.5 Método para la determinación de ácidos grasos	30

3.3 Método de Espectroscopia Infra-Roja	32
3.3.1 Fundamentos teóricos de la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	32
3.3.2 Método de Espectroscopia Infrarroja para la cuantificación de grasas trans	33
3.3.3 Reflectancia total atenuada	36
3.3.4 Usos de la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier	37
3.4 Validación	39
3.4.1 Definición	39
3.4.2 Parámetros de desempeño	40
3.4.3 Documentación	44

CAPÍTULO IV

4.0 Diseño metodológico	47
4.1 Tipo de estudio	47
4.2 Investigación bibliográfica	47
4.3 Investigación de campo	48
4.4 Parte experimental	48
4.4.1 Toma de muestra	48
4.4.2 Materiales y equipos	49
4.4.3 Reactivos	49
4.4.4 Evaluación de parámetros de desempeño	50
4.4.5 Análisis de muestra y estándar en IR	59

CAPÍTULO V

5.0	Resultados y discusión de resultados	63
5.1	Determinación de linealidad del método	63
5.2	Determinación de la precisión del sistema	66
5.3	Determinación de la precisión del método	66
5.4	Determinación de la precisión intermedia del método	69
5.5	Repetibilidad del método	74
5.6	Exactitud del método	77
5.7	Resumen de resultados	78
5.8	Elaboración de protocolo de validación	80
5.9	Elaboración de reporte de validación	92
5.10	Elaboración de certificado de validación	100

CAPÍTULO VI

6.0	Conclusiones	105
-----	--------------	-----

CAPÍTULO VII

7.0	Recomendaciones	107
	Bibliografía	109
	Anexos	111

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Cuadro de parámetros para métodos normalizados según guía de validación de CONACYT
2. Método oficial de análisis infrarrojo de grasas según AOAC
3. Certificado de análisis de estándar de Trioleina
4. Certificado de análisis de estándar de Trielaidina
5. Procedimiento en el equipo de espectrofotometría infrarrojo IR-Shimadzu Affinity
6. Cálculo de linealidad
7. Espectro infrarrojo de los estándares que conforman la curva de Calibración
8. Cálculo de precisión del método
9. Espectros Infrarrojos combinados para el cálculo de precisión del método de margarina Dany
10. Espectros Infrarrojos combinados para el cálculo de precisión intermedia del método de margarina Dany
11. Espectros Infrarrojos combinados para el cálculo de precisión del método de margarina Cremy
12. Espectros Infrarrojos combinados para el cálculo de precisión intermedia del método de margarina Cremy

13. Espectros Infrarrojos combinados para el cálculo de precisión del método de margarina Suly
14. Espectros Infrarrojos combinados para el cálculo de precisión intermedia del método de margarina Suly
15. Cálculo de repetibilidad del método
16. Cálculo de exactitud del método

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág.
1	Composición de la margarina según las Normas NMX-F-016-SCFI-2007	26
2	Cuadro de resumen de los parámetros de desempeño a evaluar para la cuantificación de grasas trans en margarina	50
3	Tabla de resultados de la linealidad del método	64
4	Tabla de resultados de la precisión del método para margarina Dany	67
5	Tabla de resultados de la precisión del método para margarina Cremy	68
6	Tabla de resultados de la precisión del método para margarina Suly	68
7	Tabla de resultados de la precisión intermedia del Método para margarina Dany	69
8	Tabla de resultados de prueba F para varianzas de dos muestras de margarina Dany	70
9	Tabla de resultados de la precisión intermedia del método para margarina Cremy	71
10	Tabla de resultados de prueba F para varianzas Margarina Cremy	72
11	Tabla de resultados de la precisión intermedia del método para margarina Suly	73
12	Tabla de resultados de prueba F para varianzas margarina Suly	74
13	Tabla de resultados de repetibilidad del método para margarina Dany	75
14	Tabla de resultados de repetibilidad del método para margarina Cremy	75
15	Tabla de resultados de repetibilidad del método para margarina Suly	76
16	Tabla de resultados de exactitud del método	77
17	Tabla resumen de resultados de validación del Método analítico para la cuantificación de grasas trans en margarina	78

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág.
1	Similitud entre un ácido graso saturado y un insaturado con configuración trans	28
2	Esquema del sistema óptico de un espectrofotómetro FTIR	34
3	Reflexión total interna y cristal de reflexión interna (SeZn) Utilizando el sistema HATR	37
4	Etiqueta de identificación de muestra	49
5	Imagen de estándar de Trioleina y Trielaidina	50
6	Recta de regresión ajustada (estándares Trioleina como (estándar negativo y Trielaidina como estándar positivo)	65
7	Cuadro de parámetros guía del CONACYT	113
8	Acercamiento del Espectro Infrarrojo de los estándares que conforman la Curva de Calibración	135
9	Espectro Infrarrojo de los estándares q conforman la Curva de Calibración	136
10	Acercamiento del espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Dany	142
11	Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Dany	143
12	Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Dany	145
13	Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Dany	146
14	Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Cremy	148
15	Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Cremy	149

16	Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Cremy	151
17	Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Cremy	152
18	Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Suly	154
19	Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Suly	155
20	Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Suly	157
21	Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Suly	158

ABREVIATURAS

ACS	American Chemical Society (Sociedad Americana de Química)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)
AOCS	American Oil Chemists' Society (Sociedad Americana de Químicos del Aceite)
ATR	Attenuated Total Reflectance (Reflectancia Total Atenuada)
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CV	Coeficiente de Variación
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (Ésteres de Metilo de Acidos Grasos)
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización para la Agricultura y la Alimentación)
FID	Flame Ionization Detector (Detector de Ionización de Llama)
FR	Factores de Respuesta
FT	Fourier Transformation (Transformada de Fourier)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier)
GC	Gas Chromatography (Cromatografía de Gases)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de Alta Densidad)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Definición)
IEC	International Electrotechnical Commission (Comisión Electrotécnica Internacional)
IR	Infrared Radiation (Radiación Infrarroja)
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)

LC	Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida)
LDL	Low-Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baja Densidad)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Optical Path Difference (Diferencia de la Trayectoria Óptica)
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids (Ácidos Grasos Poliinsaturados)
RSD	Relative Standard Deviation (Desviación Estándar Relativa)
SFA	Saturated Fatty Acids (Ácidos Grasos Saturados)
TFA	Trans Fatty Acids (Ácidos Grasos Trans)
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografía en Capa Fina)
UCA	Universidad Centroamericana
UES	Universidad de El Salvador
UI	Unidades Internacionales
UNAB	Universidad Dr. Andrés Bello
USAM	Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objeto proponer la validación del método de Espectroscopia Infrarroja para la Cuantificación de Grasas Trans en Margarina basándose en el método oficial para cuantificar grasas Trans de la Asociación Americana de Químicos Analistas (AOAC). El análisis de las muestras fue llevado a cabo en las instalaciones del Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. Se trabajó con muestras de margarina que presentaron grasas trans en su composición de acuerdo a investigaciones anteriores y se utilizaron los estándares de Trioleina y Trielaidina para poder cuantificar las grasas trans presentes. Ésta investigación se desarrolló en base a lo que establece la Guía de Validación de Métodos Analíticos dada por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT). La investigación se realizó durante el período comprendido entre abril de 2014 a enero de 2015.

Se elaboró el protocolo de validación respectivo del método en estudio, donde se documentó los objetivos, las responsabilidades, método analítico, instrumentos, parámetros de desempeño con sus procedimientos y criterios de aceptación, reportando los resultados obtenidos en el respectivo informe y certificado de validación del método.

Los parámetros de desempeño evaluados en la validación fueron: linealidad del método, precisión del sistema, precisión del método y exactitud del método. Para cada uno de estos parámetros se muestra el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos y se demostró que el método en estudio fue lineal, preciso y exacto, obteniendo así los siguientes resultados: en la linealidad del método se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) igual a 0.997 y un Coeficiente de Variación (CV) igual 3.84%, el segundo parámetro evaluado fue la precisión del sistema donde se obtuvo un coeficiente de variación (CV) igual a

1.75%, para la precisión del método se obtuvieron valores de Coeficiente de Variación (CV) de 2.45% para margarina Dany, de 2.76% para margarina Cremy y de 1.75% para margarina Suly. Para la precisión intermedia del método los Coeficientes de Variación (CV) de los dos analistas fueron iguales a 5.78% para margarina Dany, 5.42% para margarina Cremy y 4.27% para margarina Suly, y finalmente, la exactitud brindó una media de porcentaje de recobro de 101.31%. Los criterios de aceptación que se establecieron fueron: para la linealidad que el Coeficiente de Determinación debe ser mayor o igual a 0.98, para el Coeficiente de variación (CV) debe ser menor o igual a 5.0% dado por el Codex Alimentario y para el porcentaje de recobro debe estar entre el rango de 97.0% a 105.0%.

Basándose en los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño evaluados aplicando el método de Espectroscopia Infrarroja para la Cuantificación de grasas trans en margarina, podemos decir que el método es confiable y seguro para su utilización, ya que demostró ser lineal, exacto y preciso por lo que puede ser empleado en el Laboratorio Físicoquímico de Agua de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Para próximos estudios realizados se recomienda utilizar siempre los estándares que se indican en la técnica de análisis para así asegurarse de obtener resultados, confiable y exactos; así como también utilizar esta técnica de análisis en otras marcas de margarina nacionales e internacionales así como también su aplicación en otras matrices alimenticias.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

El estudio de las grasas trans es de suma importancia ya que como sabemos son perjudiciales para la salud causando enfermedades complejas como diabetes, enfermedades cardíacas entre otras.

Las grasas trans se pueden encontrar en los ácidos grasos que han sufrido un proceso de hidrogenación ya sea por su exposición a altas presiones o temperaturas, entre las cuales se encuentran las margarinas, las cuales son 100% vegetales y se obtienen a partir de grasas con un elevado porcentaje de ácido linoleico, una parte del cual debe ser saturado con hidrógeno para que el alimento sea más estable, lo que hace que se originen grasas hidrogenadas y de configuración trans, que en nuestro organismo se comportan como las grasas saturadas.

En el presente trabajo de investigación se realizó una propuesta de validación del método de espectroscopia infrarroja para la cuantificación de grasas trans en margarina, basándose en la metodología oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas, el cual se adecuó a las condiciones del Laboratorio fisicoquímico de aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Se utilizaron tres marcas de margarina: Suly, Dany y Cremy vitaminada, todas ellas en presentación barra, las cuales produjeron el pico de absorción característico de ácidos grasos trans en la región de 966cm^{-1} en cada uno de los espectros infrarrojos obtenidos según el trabajo de graduación de Adecuación del Método de Espectroscopia Infrarroja en la Identificación de Grasas Trans en Margarina. La toma de muestra se llevó a cabo en los supermercados del área de centro comercial metrocentro de San Salvador en el período de Abril a Mayo de 2014 y fueron analizadas en el Laboratorio Fisicoquímico de aguas de la

Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, durante el mismo período de tiempo.

Con los resultados obtenidos se procedió a la interpretación de estos para evaluar los parámetros de aceptación, y se elaboró el protocolo de validación, el informe de validación y el certificado de validación.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer la validación del método de espectroscopia infrarroja para la cuantificación de grasas trans en margarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Elaborar el protocolo de validación para la determinación de grasas trans en margarina estableciendo el cumplimiento de los parámetros de desempeño.
- 2.2.2 Evaluar los parámetros de desempeño: Linealidad del método, precisión del sistema, precisión del método y exactitud aplicando el método de estudio y estableciendo los criterios de aceptación.
- 2.2.3 Interpretar los resultados obtenidos en cada parámetro de estudio, por medio de técnicas estadísticas para establecer si cumplen con los criterios de aceptación.
- 2.2.4 Elaborar el informe de validación y el certificado según los resultados obtenidos.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 LA MARGARINA

3.1.1 Definición ^(11, 12)

La Margarina es un producto alimenticio llamado en un primer momento oleomargarina, ésta se define como una emulsión plástica del tipo agua en aceite, obtenida principalmente a partir de grasas y aceites comestibles que no procedan fundamentalmente de la leche; con un porcentaje mínimo de materia grasa del 80% y un contenido máximo de agua del 16%.

La margarina es el producto alimenticio de aspecto similar a la mantequilla y es elaborado por la emulsión estabilizada de grasas y aceites vegetales o animales comestibles modificados o sin modificar por hidrogenación, fraccionación o interesterificación, incorporados de agua y adicionados o no de leche, sólidos de leche, ingredientes opcionales y aditivos alimentarios permitidos, en donde el contenido de grasa debe ser mínimo de 60%. Aunque en la norma CODEX STAN 32-1981, se considera que la margarina debe tener un contenido de grasa mínimo de 80% y de agua menor a 16%.⁽¹⁰⁾

3.1.2 Historia ⁽³⁾

Mége-Mouriés, químico francés, especialista en investigaciones alimentarias, tras algunos años de estudio, propone en 1870 un procedimiento muy simple que permitía fabricar a partir de sebo de buey, una grasa alimenticia extensible, de uso universal y con un precio netamente inferior al de la mantequilla, el cual dio a éste nuevo producto el nombre de oleo-margarina.

Posterior a la guerra de 1870, esta patente de invención habría caído en el olvido de no haber sido comprada por unos comerciantes holandeses que se interesaron particularmente por esta nueva grasa. Así iba a nacer la margarina y una gran industria que, desde el final del siglo XIX está en plena expansión.

A partir de 1930, fecha en que aparecieron industrialmente los aceites hidrogenados, empezaron a utilizarse estos aceites vegetales endurecidos por hidrogenación, cuya utilización continua estando vigente en la actualidad.

En Francia, la margarina que se desarrolló alrededor de 1870 se hacía a base de grasa animal derretida. La margarina a base de grasa animal es una industria importante en la cual utilizan materia prima de diferente origen.

Es así como en Canadá y varios países europeos, la margarina se elabora a base de aceite de pescado hidrogenado y desodorizado, mientras que en los Estados Unidos la mayor parte de la margarina se hace con aceites vegetales, y margarina de aceite de pescado.

3.1.3 Clasificación ⁽²⁾

Existen 3 tipos de margarinas según su origen, las cuales son:

- a) **Margarinas vegetales:** si las grasas que la forman son de origen vegetal.
- b) **Margarinas animales:** si las grasas son de origen animal.
- c) **Margarinas mixtas:** si tienen mezcla de grasas de origen animal y vegetal.

3.1.4 Composición ⁽⁸⁾

La margarina puede fabricarse con un único aceite, siendo el más habitual el de girasol, o con una mezcla de aceites, tanto vegetales como animales. Otros ingredientes que pueden añadirse a la margarina son: sal, colorantes y vitaminas. El hecho de ser un producto constituido mayoritariamente a partir de componentes vegetales beneficia sin duda, la percepción del consumidor, aunque pocos son los que conocen que no siempre la margarina es 100% vegetal. ⁽⁵⁾

Las grasas y los aceites pueden ser de origen vegetal, animal. Las grasas vegetales incluyen formas sólidas como manteca de cacao, y líquidas como aceite de semilla de maíz, aceite de soya, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuate, aceite de olivo y muchas más. Generalmente sometidos al proceso de hidrogenación, que consiste en la introducción de átomos de hidrógeno en los dobles enlaces, con esto se saturan los ácidos grasos y se eleva su punto de fusión, es decir, se endurece el aceite. Las grasas animales como manteca, sebo, y aceites marinos. ⁽¹⁾

Existen en el mercado diversos tipos de margarinas de mesa y se pueden clasificar de acuerdo a la norma mexicana NMX-F-016-SCFI-2007 como: margarina (que se denominará estándar), margarina reducida en grasa y margarina light. En la tabla N° 1 se reporta la composición de éstas margarinas.

Tabla N° 1. Composición de la margarina según las Normas NMX-F-016-SCFI-2007.

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Humedad %	-	40
Grasa %	60	-
Conservadores %	-	0.20
NaCl en margarina sin sal %	-	0.5
NaCl en margarina con sal %	-	2.5
Punto de Fusión	-	38 °C
Vitamina A en UI/1 kg	20 000	-

3.1.5 Componente de la Margarina ^(1, 11)

Las materias primas necesarias fundamentalmente son:

- a) **Grasas:** materia lipídica de diverso tipo y características.
- b) **Agua:** En una proporción inferior al 16%. Se utiliza para preparar la emulsión con la sustancia grasa dispersando ésta en pequeñas gotitas en el agua.
- c) **Sal refinada:** Esta debe ser prácticamente anhidra, $H_2O < 0,1 \%$. Neutra o muy débilmente alcalina. No debe poseer sales de magnesio, incluso al estado de trazas (en particular cloruro de magnesio), que acelera la oxidación de las grasas. No debe contener sulfatos. No debe tener hierro, que es un pro-oxidante de las grasas y aceites y en disolución debe dar una salmuera clara, sin espuma y sin precipitado.
- d) **Aditivos:** Para obtener la emulsión se mezclan las grasas con el agua, hasta obtener un producto de consistencia y aspecto similar a la mantequilla. Para ello se necesitan una serie de aditivos como lo son los emulsionantes que favorecen la unión de los dos componentes impidiendo su separación, se utiliza la lecitina obtenida de la soja, monoglicéridos y diglicéridos.

3.2 GRASAS TRANS

3.2.1 Concepto ⁽⁴⁾

Se definen como grasas trans los ácidos grasos insaturados que contienen uno o más dobles enlaces aislados, no conjugados, en una configuración geométrica trans. Estructuralmente, los ácidos grasos trans son similares a los ácidos grasos saturados y tienen propiedades físicas intermedias entre los ácidos grasos cis y los ácidos grasos saturados.

La grasa trans puede encontrarse en muchos de los mismos alimentos que la grasa saturada, como grasas vegetales, algunas margarinas, galletas, caramelos, dulces, meriendas, alimentos fritos, productos horneados y en otros alimentos procesados hechos con aceites vegetales parcialmente hidrogenados.

También conocidos como ácidos grasos trans, las grasas trans pueden encontrarse de forma natural en algunos alimentos de origen animal como la leche, productos lácteos y carnes.

3.2.2 Formación de ácidos grasos trans. ⁽⁷⁾

Los ácidos grasos trans pueden encontrarse en productos obtenidos industrialmente por hidrogenación a partir de aceites vegetales o de pescado; en aceites sometidos al calentamiento y cocción a temperaturas altas; en grasas y aceites desodorizados a temperaturas altas (200°C) debido a la isomerización de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), como el linoleico (C18:2 n-6) y α -linolénico (C18:3 n-3) y en menor cantidad (representando hasta el 3% de la fracción grasa) en la leche y la carne de rumiantes, debido a la transformación bacteriana de los ácidos grasos insaturados en el rumen de vacas, ovejas y cabras. Se considera que aproximadamente una tercera parte de las grasas y aceites comestibles en el mundo son hidrogenadas.

3.2.3 Estructura Química

La configuración cis origina un ángulo en dicha posición, provocando un acodamiento en la molécula que impide el empaquetamiento ordenado de las cadenas hidrocarbonadas, requiriéndose menor energía para romper las fuerzas intermoleculares entre los ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos en configuración trans son los minoritarios en la naturaleza y tienen una posición espacial ordenada similar a la de los SFA (Ver figura N°1).



Figura N°1. Similitud entre un ácido graso saturado y un insaturado con configuración trans.

3.2.4 Como afecta a la Salud ⁽⁴⁾

Lo más importante que debe conocer el consumidor sobre la grasa trans es que se comporta en el organismo igual que la grasa saturada, elevando la lipoproteína de baja densidad (LDL, o colesterol malo) lo que puede aumentar el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

Muchos consumidores ya saben lo conveniente que es limitar la grasa saturada y el colesterol en su dieta, pero la grasa trans es un término menos familiar. Cuando se trata de la grasa trans y de su organismo, esta es la forma en que funciona:

- Al igual que las grasas saturadas y el colesterol, las grasas trans aumentan la lipoproteína de baja densidad (LDL, o colesterol malo) en la sangre, lo que aumenta el riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca coronaria.
- La grasa trans también baja la lipoproteína de alta densidad (HDL, o colesterol bueno) en la sangre.
- Para reducir el riesgo de padecer de una enfermedad cardíaca coronaria, el objetivo consiste en disminuir el nivel general de colesterol LDL. La reducción de la cantidad de grasas saturadas, de grasa trans y de colesterol en su dieta puede contribuir a disminuir su nivel de colesterol LDL.

Los estudios metabólicos han proporcionado evidencia de que los ácidos grasos trans aumentan en el plasma las concentraciones de LDL-colesterol y reducen las concentraciones de HDL-colesterol. Este efecto es más peligroso comparado con el de los ácidos grasos saturados, ya que éstos incrementan tanto la concentración de LDL-colesterol como de HDL-colesterol. Además, hay estudios que sugieren que los ácidos grasos trans pueden afectar el crecimiento y el desarrollo fetal humano y están asociados con la prevalencia de asma y alergias en niños y el riesgo de desarrollar diabetes en adultos. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO,

por sus siglas en inglés) recomiendan limitar el consumo de TFA a menos del 1% del aporte energético alimentario diario. ⁽⁹⁾

3.2.5 Método para la determinación de ácidos grasos ⁽⁷⁾

Actualmente los métodos analíticos más empleados para la determinación de ácidos grasos cis y trans en grasas y aceites son la cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) y espectroscopia infrarroja (IR, por sus siglas en inglés). En el caso de la GC, existen 2 métodos oficiales, uno para grasas y aceites que emplea una columna capilar y otro para margarinas que usa una columna empacada; en ambos métodos la GC está acoplada a un detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés).

En los métodos de GC capilar, la limitación clave ha sido la incompleta separación de los isómeros trans del ácido octadecanoico, debido al traslapamiento de algunos isómeros cis y trans con diferentes posiciones de los dobles enlaces, aunque actualmente se ha mejorado la separación con columnas capilares de 100mm altamente polares de sílica fundida. Los datos obtenidos pueden ser lo suficientemente exactos para las aplicaciones de control de calidad y para el etiquetado de alimentos, pero si se requiere una mayor exactitud y menor traslapamiento de cada tipo de los isómeros, la GC debe ser usada en conjunción con otra técnica de separación, como es la cromatografía en capa fina con argentación (Ag⁺-TLC, por sus siglas en inglés) o la cromatografía líquida con argentación (Ag⁺-LC, por sus siglas en inglés).

Alternativamente, la GC acoplada con la espectrometría de masas es el método más conveniente para la determinación de la posición de los dobles enlaces, sin embargo, es un método más costoso en términos de su adquisición y costos de mantenimiento.

Aunque trabajables, estos métodos son algo complicados y no son adecuados para aplicaciones rutinarias. Por otro lado, el método de la American Oil Chemists' Society (AOCS) y el de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para la cuantificación de ácidos grasos trans por espectroscopia IR está basado en la medición de la vibración flexión característica de los enlaces trans aislados a 966 cm^{-1} (10.3 μm). Con el uso del accesorio de reflectancia total atenuada horizontal (ATR) en la espectroscopia FTIR, no es necesario que las muestras sean diluidas en disolventes por lo que aumenta la exactitud y rapidez del método.

Actualmente la espectroscopia infrarroja ofrece la posibilidad de reemplazar los métodos tradicionales, ya que presenta algunas ventajas frente a los otros métodos: es una técnica rápida y no destructiva, actualmente con el software estadístico se puede manipular fácilmente la información espectral y se es capaz de realizar calibraciones multivariantes. Además, esta técnica es adecuada para el uso industrial debido a su facilidad de uso y el relativamente bajo costo financiero de obtener y correr el equipo. El método tiene el potencial de ser usado para el chequeo y monitoreo de productos grasos y la determinación de ácidos grasos trans totales para propósitos de etiquetado.

Comparado con el método oficial de GC, el método de FTIR -ATR no demanda el uso de otros disolventes, analiza grasas y aceites directamente en su forma pura y no requiere de derivatización de las grasas a ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME). Sin embargo, por sí sólo el método de FTIR-ATR únicamente proporciona los ácidos grasos trans totales, independientemente de la localización del doble enlace trans en la molécula, por lo que a diferencia de la GC, no se pueden identificar el tipo de ácidos grasos cis y trans presentes.

El desarrollo de un método quimiométrico basado en la alimentación de espectros FTIR-ATR y en datos de identificación y cuantificación de ácidos grasos cis y trans por GC, ofrece el potencial de combinar la velocidad específica del método FTIR-ATR, y la especificidad del método de GC pero sin el tiempo de preparación y uso de solventes que involucra éste último, para así correlacionar directamente los espectros obtenidos con el tipo y cantidad de ácidos grasos cis y trans de las muestras de margarina.

El desarrollo de modelos de éste tipo puede ser laborioso, éstos son específicos para la matriz a analizar (margarina) y no pueden ser aplicados a otros productos (aceites), lo que podría ser considerado como una desventaja, pero este modelo necesita ser desarrollado una sola vez, en cambio en la GC cada muestra debe ser convertida a su respectivo FAME y analizada independientemente.

3.3 METODO DE ESPECTROSCOPIA INFRA-ROJA ⁽⁷⁾

3.3.1 Fundamentos teóricos de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizando reflectancia total atenuada horizontal (ATR)

La espectroscopia infrarroja (IR) es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética infrarroja y la materia. El principio fundamental se basa en que al interactuar la radiación infrarroja con una molécula, la energía incidente a una frecuencia específica se absorbe cuando coinciden con la frecuencia de vibración de un movimiento molecular específico, produciendo vibración en los enlaces químicos de la materia, generando un cambio neto en el momento dipolar intrínseco de la molécula.

Los átomos dentro de una molécula están en constante movimiento unos respecto a otros, vibrando en torno a los enlaces que los unen a frecuencias constantes y específicas, conocidas como estados de vibración. Hay dos clases

de vibraciones moleculares, la de tensión y la de flexión. En una vibración de tensión hay un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, existen dos tipos: asimétrica y simétrica. Mientras que en las vibraciones de flexión se presenta un cambio en el ángulo entre dos enlaces, hay cuatro tipos: Tijereteo, Torsión, Balanceo y Aleteo.

La frecuencia de vibración y de flexión de un enlace está determinada principalmente por la masa de los átomos que participan en él y por la fuerza del enlace. Mientras más pequeña sea la masa del átomo, mayores serán las frecuencias vibracionales.

Los enlaces que caracterizan los grupos funcionales tienen frecuencias específicas a las cuales absorben y bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro. Esto genera un espectro de absorción característico para una molécula dada, como si fuera una huella digital que revela información detallada acerca de la estructura y composición de una muestra, ya que no existen dos compuestos que absorban exactamente en la misma forma. Por consiguiente, la absorción o la falta de absorción en la región infrarroja se puede usar para identificar los tipos de grupos funcionales presentes en una molécula.

3.3.2 Método de Espectroscopia Infra-Roja para la cuantificación de Grasas Trans

El primer espectrofotómetro FTIR comercial estuvo disponible a finales de los 60's. Actualmente, debido al rápido desarrollo comercial y la amplia investigación, la espectroscopia FTIR es considerada como una de las técnicas más potentes para el análisis químico. Debido a su simplicidad, sensibilidad, versatilidad y rapidez de análisis, su aplicación en análisis biológicos, incluyendo alimentos, ha crecido rápidamente.

El diagrama esquemático de un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se presenta en la Figura N°2. Los principales componentes son la fuente infrarroja, un interferómetro (divisor de haces y espejos reflectantes), el detector y el láser de referencia.

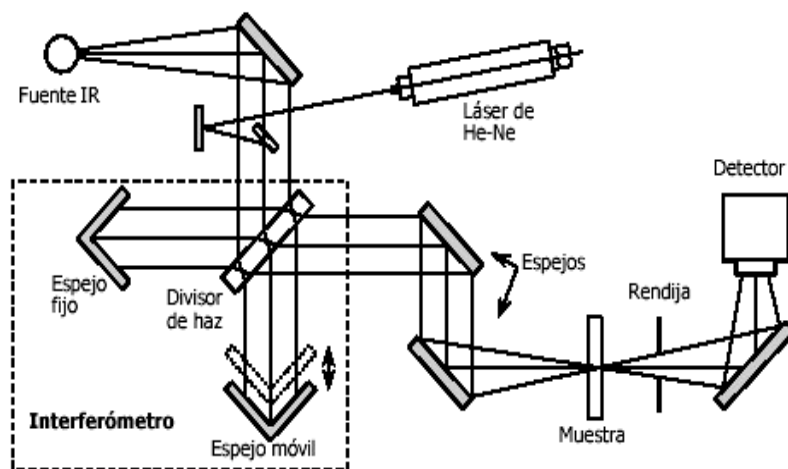


Figura N°2. Esquema del sistema óptico de un espectrofotómetro FTIR.

En el espectrofotómetro FTIR, la fuente emite luz en la región de IR, ésta se dirige con un espejo hacia el divisor de haz, donde se divide en dos, la mitad del rayo pasa por un espejo fijo y la otra mitad se refleja sobre un espejo móvil que es capaz de moverse a lo largo del eje, desde y hacia el divisor de haz.

Estos dos haces de luz interfieren en el divisor después en su viaje de vuelta al ser reflejados sobre otros dos espejos. Cuando las haces son recombinados se obtiene un modelo de interferencia, dependiendo de la diferencia de la trayectoria óptica (OPD), la cual es creada por el movimiento del espejo móvil. De esta forma se obtiene la denominada figura de interferencia, que permitirá medir pequeñas variaciones en cada uno de los caminos seguidos por los haces. La intensidad resultante de la superposición de los dos haces es medida como función del desfase del espejo móvil en su desplazamiento respecto a la posición intermedia.

El gráfico resultante (intensidad vs. desfase) se denomina interferograma de la fuente.

En el FTIR la muestra se coloca entre el Interferómetro (del cual emerge la luz recombinada procedente del divisor de haz) y el detector. La muestra absorbe ciertas frecuencias de la radiación y posteriormente pasa al detector. La señal resultante en el detector se conoce como interferograma de la muestra, esta señal analítica es detectada, amplificada y corresponde al interferograma de la fuente menos el de la muestra.

El interferograma es una señal muy compleja que muestra la media de la intensidad de energía contra todas las frecuencias de la luz transmitidas simultáneamente por la muestra en función del tiempo. La interpretación o resolución del interferograma se realiza matemáticamente utilizando la transformación de Fourier. El análisis de Fourier es un tratamiento matemático en el cual una curva dada (interferograma) se descompone en una suma de términos seno-coseno llamada serie de Fourier. Este cálculo se realiza gracias a un programa del ordenador para obtener el espectro en el dominio de la frecuencia o espectro convencional absorbancia (o %T) vs. número de onda.

Esta técnica tiene varias ventajas específicas sobre los métodos dispersantes convencionales. En primer lugar, los haces ópticos son de buena intensidad, es decir, una mayor energía de flujo del haz de luz llega al detector puesto que no tiene rendijas o lentes donde se pierda la intensidad de luz. Por otro lado, en la exploración se detectan simultáneamente todas las longitudes de onda y el FTIR logra la misma relación espectral señal-ruido de un espectrómetro dispersante en menos de 1 segundo. Otra ventaja es la denominada ventaja del registro o de Conne, la cual permite determinar con precisión y exactitud la posición de muestreo utilizando un láser interno de referencia. Otras ventajas derivan de esto, incluyendo rápido tiempo de exploración, alta resolución, alta exactitud en el número de onda, gran intervalo de exploración y alta sensibilidad.

3.3.3 Reflectancia total atenuada

La reflectancia total atenuada es una de las técnicas de muestreo más usadas en la espectroscopia infrarroja. Cuando un haz de infrarrojo viaja de un medio de índice de refracción muy alto a un medio de índice de refracción bajo (muestra), una cierta cantidad de la luz es reflejada de nuevo en el medio de bajo índice de refracción, en un ángulo de incidencia particular, casi la totalidad de las ondas de luz se refleja de vuelta, este fenómeno se llama reflexión interna total (Ver figura N°3).

En esta condición, una cierta cantidad de la energía de la luz se escapa del cristal y se extiende una pequeña distancia (0.1-5 micrómetros) más allá de la superficie en forma de ondas, a esta onda invisible se le llama onda evanescente. La intensidad de la luz reflejada se reduce o atenúa en este punto, este fenómeno se llama reflectancia total atenuada, pero el ángulo de la luz incidente y la geometría del cristal facilitan que se produzcan sucesivas reflexiones en sus caras internas. La muestra se aplica sobre el cristal ATR y una cierta cantidad de la radiación IR proveniente de la fuente penetra más allá del cristal y es absorbida por la muestra, esta absorción se traduce en el espectro IR de la muestra.

Esta técnica de muestreo es muy efectiva para el análisis de sólidos y líquidos, sin importar el espesor de las muestras y sin pretratamiento alguno. Para obtener medidas adecuadas es necesario un contacto íntimo entre la muestra y el cristal del ATR. En muchas de las aplicaciones de la reflectancia total atenuada, se utilizan celdas verticales, sin embargo, esto provoca problemas para alcanzar un contacto uniforme entre la muestra y el cristal; además, el análisis de pastas, geles y líquidos es casi imposible debido a la posición del accesorio. Para evitar esto, se ha desarrollado el accesorio de ATR con cristal horizontal (HATR), el cual mantiene la muestra en contacto íntimo y uniforme en una posición horizontal, lo que permite el análisis de todo tipo de materiales.

La técnica HATR produce espectros infrarrojos altamente reproducibles y de buena calidad, sobre todo si existe un buen contacto entre la muestra y el cristal de selenuro de zinc.

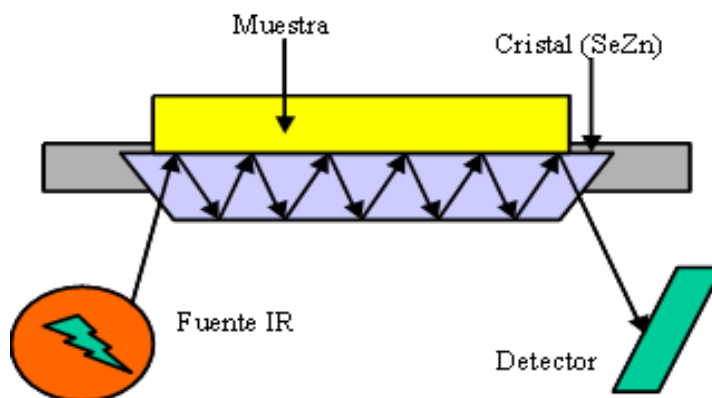


Figura N°3. Reflexión total interna y cristal de reflexión interna (SeZn) utilizando el sistema HATR.

3.3.4 Usos de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

En la actualidad, las técnicas espectroscópicas han llegado a ser consideradas como herramientas de análisis atractivas y prometedoras en pruebas realizadas para la investigación, el control o los laboratorios industriales, por ser una tecnología rápida, barata, sensible y no destructiva, usada para el análisis de salida de componentes alimenticios. Es por ello que la espectroscopia es cada vez más considerada por los analistas como una solución obvia.

Los avances de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en cuanto a la instrumentación, el uso extensivo de las computadoras y el desarrollo de procedimientos adecuados de quimiometría han hecho posible extraer información relacionada con la composición y estructura de componentes alimenticios provenientes del espectro. Algunas de las áreas generales de aplicación en los alimentos incluyen: el estudio de las interacciones entre sus componentes, la cuantificación de los nutrientes y otros compuestos específicos,

la caracterización estructural de las moléculas, la determinación de la calidad de las materias primas y aditivos y la detección de la adulteración o autenticidad de los alimentos.

En el área de productos grasos y aceites comestibles algunos estudios empleando FTIR son los siguientes: ha sido usada para clasificar muestras de aceites, mantequilla y margarina en función del grado de esterificación e insaturación; para determinar el contenido de grasa total y humedad en mantequilla y en productos como mayonesa y mantequilla de maní; para cuantificar el contenido de ácidos grasos trans totales en mantequilla, en margarina y en productos de panificación; para caracterizar mantequilla, aceite de soya y manteca. También se ha determinado el perfil de ácidos grasos en grasas y aceites vegetales, en leche y en carne de cerdo. Se ha monitorizado la formación de ácidos grasos trans en grasas hidrogenadas sometidas a altas temperaturas; se han estudiado cambios en el índice de peróxido, ácidos grasos libres y densidad de aceites para freído; se han evaluado impurezas en aceites vegetales refinados; se ha determinado la eficiencia de antioxidantes en aceite de girasol y verificado la autenticación de aceites vegetales, entre otros muchos estudios.

En otros productos grasos se ha determinado grasa, humedad, proteínas y lactosa en leche y el contenido de colesterol en productos lácteos; se ha estudiado la cuantificación de aceites esenciales de varios cítricos y se ha estudiado la clasificación y detección de adulterantes en aceites utilizados como suplementos dietéticos.

En general en el sector alimentario se han analizado con éxito diversos alimentos como carnes, quesos, vinos, vinagre, café, chocolate, mieles, azúcares, jugos de frutas, cereales, entre otros.

3.4 VALIDACION.

3.4.1 Definición ⁽⁶⁾

Frecuentemente, los laboratorios tanto del sector químico, industrial, farmacéutico y ambiental manifiestan la necesidad de implementar sistemas que puedan asegurar la calidad establecida bajo normas internacionales, con el propósito de lograr los niveles más elevados de confiabilidad, tanto en materiales, equipos, metodologías y en calidad de los datos que se generan a partir de ellos.

Uno de los elementos primordiales que proveen calidad a los laboratorios es el empleo de métodos analíticos validados. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual demuestra por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito. Por lo que la validación de métodos analíticos según la Norma Salvadoreña ISO/IEC17025:2005 contiene los requisitos generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración.

Ya que la validación es establecida por medios de estudios experimentales, que demuestran científicamente que el procedimiento analítico posee las características de desempeño adecuadas, para dar cumplimiento a los requerimientos de las aplicaciones analíticas adecuadas.

En función de la aplicación analítica de un método los parámetros de desempeño a estudiar pueden ser:

- Precisión/adecuabilidad del sistema
- Linealidad del sistema
- Especificidad o selectividad
- Exactitud y repetibilidad
- Linealidad del método
- Precisión del método o precisión intermedia
- Estabilidad analítica de la muestra

- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Robustez
- Tolerancia.

3.4.2 Parámetros de desempeño.

a) Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

No debe confundirse la exactitud y precisión. Pues la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está el valor verdadero. Para que un método sea exacto requiere de un cierto grado de precisión.

Para definición de exactitud surge el principal problema de cuál es el valor aceptado como verdadero de un determinado analito; el valor verdadero en muchos casos se desconoce, pero cuando se disponen de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como verdadero, por lo que la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón.

La exactitud experimentalmente se establece a través del rango especificado en el procedimiento analítico, pudiendo ser evaluado con un mínimo de tres niveles de concentración cada uno por triplicado y debiendo ser reportado su resultado como porcentaje de recobro de la cantidad del estándar de referencia o por la diferencia entre el porcentaje promedio del ensayo y el valor aceptado como verdadero.

b) Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas y tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo de estudiar la precisión en un método es conocer la variabilidad que pudiera haber en el mismo, esta variabilidad pudiera deberse a errores inherentes al método de ensayo, entre los factores que influyen en las causas de error sobre los resultados podemos tener: error del analista, error del equipo o instrumental, error causado por reactivos, etc. De aquí la importancia de estudiar este parámetro. En la precisión se puede considerar tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad.

- **Repetibilidad:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en un periodo corto.
- **Precisión intermedia:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes y en un mismo día. La precisión del método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas de igual manera que la repetibilidad.
- **La reproducibilidad:** estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión se determina con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, y se expresa dando el valor medio obtenido junto con el mas-menos de la variabilidad de los resultados.

c) Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación, para lo cual se espera obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales del analito en muestra. Por lo que se evalúa tanto por inspección visual de un gráfico respuesta analítica versus concentración del analito, como también por métodos estadísticos como: regresión lineal, coeficiente de determinación, intervalo de confianza de la pendiente, intervalo de confianza de la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión.

d) Intervalo

Se define como intervalo la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y la linealidad del método descrito.

El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de las pruebas, obtenidos mediante el método analítico.

e) Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método analítico para medir o cuantificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra. Puesto que es muy difícil declarar que no exista interferencia en la determinación de un analito, pues existe la posibilidad de encontrar alguna sustancia, desconocida, que interfiera.

En este estudio, como norma general, se comparan los resultados de los análisis de muestras con o sin analito en presencia o ausencia de impurezas. Y los resultados del estudio se vinculan principalmente al origen de la muestra, su preparación y las condiciones instrumentales, por lo que cualquier cambio en estos factores supone reconsiderar el estudio antes realizado.

f) Límite de detección.

Se entiende por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra, que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.

Este término no debe confundirse ni asociarse con el de sensibilidad, puesto que este método de análisis se utiliza para discriminar pequeñas concentraciones o masas de analitos.

Lo que se pretende alcanzar con el límite de detección es que el método es realmente capaz de detectar la concentración límite, por medio de una señal que se medirá con certeza, pudiendo detectar su presencia sin incurrir en falsos positivos.

La concentración del analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco. Para siete réplicas de la muestra, la media debe ser 3,14 veces superior al blanco.

g) Límite de cuantificación.

Se entenderá por límite de cuantificación la mínima cantidad de analito presente en la muestra, que se puede cuantificar, bajo condiciones descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

El valor límite cuantitativo es únicamente indicativo y normalmente no debe usarse para tomar decisiones.

h) Robustez

La robustez de un método analítico es la medida de sus capacidades para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando fiabilidad durante el empleo en rutina.

Se recomienda llevar a cabo la robustez en el desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, pues puede caerse en el error de validar un método que sea poco robusto, incurriendo malos resultados y pérdida de tiempo y dinero, por lo que es recomendable realizar un estudio de robustez donde los márgenes en los que el método es robusto puedan incluirse como parte final del método, dotándolo así de una cierta flexibilidad.

3.4.3 Documentación

a) Protocolo de validación

Cuando se realiza la validación de un método analítico es necesario contar con la documentación que sea capaz de evidenciar un objetivo, definición del sistema a validar, identificación de los parámetros, diseño del plan experimental y criterios de aceptación. Este debe ser específico para determinado método; debiendo ir firmado y fechado por las personas responsables de la validación y aprobación del mismo.

El esquema de un protocolo de validación puede incluir los puntos siguientes:

- **Objetivo:** finalidad de la validación.
- **Responsables:** relación de las personas que llevan a cabo la validación y de las que la aprobarán.

- **Parámetros a estudiar:** los parámetros se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito. (Ver Anexo N° 1)
- **Muestra(s):** el muestreo se realizará de acuerdo con procedimientos escritos, en los cuales se indicarán los sistemas de identificación y tratamiento previo de las muestras.
- **Equipo(s):** se han de identificar los equipos implicados en el proceso de validación y comprobar que están convenientemente calificados, reflejando esto en el informe de validación.
- **Referencia:** especifica el material bibliográfico del cual fundamenta el proceso.
- **Métodos analíticos:** existirían métodos que describen el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnicas y cálculos.
- **Criterios de aceptación:** se establecerán para cada uno de los parámetros y estarán basados en las necesidades o la finalidad del método y en la información recogida en la fase de desarrollo del procedimiento analítico.
- **Registro de resultados:** este incluirá el número de muestras, fecha del análisis, así como también el analista que realizará el parámetro, absorbancia correspondiente al número de muestra en estudio y la concentración de muestra de la misma.

b) Informe de validación

El contenido del informe de validación debe abarcar los siguientes datos: título, resultados, análisis de resultados, cuadro comparativo con criterios de aceptación y conclusiones.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

IV. DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO:

Retrospectivo: porque este trabajo ha sido fundamentado y desarrollado tomando como referencia investigaciones anteriores.

Prospectivo: porque los resultados podrán ser utilizados para futuras investigaciones.

Experimental: las muestras recolectadas serán analizadas en el Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Dirigido: porque es específico para las muestras que podrían presentar grasas trans en su composición.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se llevó a cabo la consulta y revisión de información en libros y trabajos de investigación y revistas con temas relacionados en:

- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES)
- Biblioteca central de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca P. Florentino Idoate, S. J. de la Universidad José Simeón Cañas (UCA)
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Biblioteca de la Universidad Dr. José Matías Delgado
- Biblioteca de la Universidad Dr. Andrés Bello (UNAB)
- Biblioteca Rafael Meza Ayau de la Universidad Don Bosco
- Internet

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

A. Universo:

Lo constituyen las tres marcas de margarina que dieron positivo a grasas trans en la investigación Adecuación del Método de Espectroscopia Infrarroja en la Identificación de Grasas Trans en Margarina.

B. Muestra:

La muestra se seleccionó tomando un lote al azar, de cada una de las marcas de margarinas Cremy vitaminada, Suly y Dany, que presentaron resultado positivo a ácidos grasos trans en el trabajo de graduación: Adecuación del Método de Espectroscopia Infrarroja en la Identificación de Grasas Trans en Margarina. Además se seleccionó una marca de margarina que no presento el pico característico de ácidos grasos trans.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

Para el análisis experimental, se utilizó el procedimiento que tiene su fundamento en el método oficial para cuantificar grasas trans de la Asociación Americana de Químicos Analistas (AOAC). (Ver Anexo N°2)

4.4.1 Toma de muestra:

Se tomó la muestra seleccionando al azar, de cada una de las marcas Cremy, Suly y Dany.

Las muestras se identificaron con una tarjeta (ver Figura N°4). Las muestras recolectadas se transportaron desde los supermercados hasta el laboratorio fisicoquímico de aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, en un depósito hermético y en condiciones equivalentes a la temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para conservar hasta donde fuese posible las características cualitativas y cuantitativas del producto.

MARCA: LOTE: PRESENTACIÓN: FECHA DE VENCIMIENTO: SUCURSAL: FECHA DE MUESTREO:

Figura N°4. Etiqueta para identificación de muestra

4.4.2 MATERIALES Y EQUIPOS

- Equipo de Espectrofotometría Infrarroja Shimadzu IR-Affinity
- Unidad de Reflectancia Total Atenuada (ATR)
- Pipeta serológica de boca ancha
- Goteros
- Baño de maría Precitherm PFV
- Termómetro
- Tubos de boca ancha de 50 mL
- Probetas de 10 mL
- Celda de bromuro de potasio (KBr)
- Jeringa de tuberculina
- Gradilla
- Espátulas
- Micropipeta

4.4.3 REACTIVOS:

- Estándares: Trioleina (Ver anexo N° 3) como estándar negativo, Trielaidina (Ver anexo N° 4) como estándar positivo. (Ver figura N° 5)



Figura N° 5. Imagen de estándar de Trioleina y Trielaidina

- Solventes: etanol (para limpieza del cristal de la unidad ATR) y acetona grado ACS (para limpieza de celda de bromuro de potasio)

4.4.4 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

En la siguiente tabla se presentan los parámetros de desempeño que han sido evaluados en la investigación con sus respectivos criterios de aceptación, estos criterios deben de mantenerse a lo largo de toda la validación y cualquier cambio debe de ser justificado.

Tabla N°2. Cuadro de resumen de los parámetros de desempeño a evaluar para la cuantificación de grasas trans en margarina.

PARÁMETRO	DETERMINACIÓN		ESPECIFICACIÓN ⁽¹³⁾
LINEALIDAD	Concentraciones del estándar	Número de determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Rango lineal - Análisis de regresión que demuestre tener: - Coeficiente de determinación (r^2) : ≥ 0.98 - Desviada al origen: $\leq 5.0\%$
	Valoración		
	0.0%	3	
	0.5%	3	
	1.0%	3	
	5.0%	3	
	10.0%	3	
	20.0%	3	
	30.0%	3	
	40.0%	3	
50.0%	3		

Tabla N° 2. Continuación

PARÁMETRO	DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN ⁽¹³⁾
PRECISION DEL SISTEMA	6 determinaciones consecutivas de la preparación del estándar al 100%	Coefficiente de variación en cuanto a: Factor de respuesta : $\leq 5.0\%$
PRECISION DEL METODO Con Producto	6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica	Coefficiente de variación de: Principios activos (concentración de muestra): $\leq 5.0\%$
EXACTITUD (RECOBRO)	Cantidades del analito, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método), para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia. La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada. Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración) 3 determinaciones de estándar al 100%	- Porcentaje de recobro: del 97.0% al 105.0% - Coeficiente de variación: $\leq 5.0\%$ - Desviación estándar: $\leq 5.0\%$
PRECISION INTERMEDIA	Cada uno de 2 analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes	Coefficiente de variación : $\leq 5.0\%$ Prueba de Fisher: Comparar La F calculada con la F tabulada

a. LINEALIDAD

Procedimiento: Se prepararon soluciones de los Estándares: trioleina y trielaidina, las concentraciones fueron del 0.0% al 50%. La concentración central fue igual a la preparación del estándar positivo 5% (límite máximo de grasas trans en margarina dada por el CODEX alimentario⁽¹³⁾, se realizaron 3 determinaciones de cada nivel de concentración de estándar, para sacar la curva de calibración. Las concentraciones de los estándares de calibración se prepararon como se indican a continuación:

- Las valoraciones con las que se evaluó el estándar positivo fueron de: 0.0%, 0.5%, 1.0%, 5.0%, 10.0%, 20.0%, 30.0%, 40.0% y 50.0% de la concentración de prueba. Para la preparación de estas soluciones se tomó que nuestro 100.0% era equivalente 0.3000 g(mezcla de estándar positivo y negativo) a partir de esto las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} 0.3000 \text{ g} \text{ ————— } 100.0\% \\ x \text{ ————— } 5.0\% \\ x=0.0150 \text{ g} \end{array}$$

Se pesó 0.0150 g de estándar positivo (para el nivel de concentración del 5%) y se completó el peso a 0.3000 g con el estándar negativo. De esta manera se prepararon los diferentes niveles de concentración de estándar para obtener la curva de calibración.

Con los datos obtenidos se calculó la estadística de la regresión y se obtuvo la curva de calibración correspondiente para estándar positivo, utilizando el software IR Solution de Shimadzu.

Fórmula utilizada para cálculo del coeficiente de determinación (r^2):

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Dónde:

- x: Concentración de la solución estándar
- y: Respuesta de la solución estándar
- n: número de determinaciones o mediciones

Fórmula utilizada para el cálculo de la pendiente (b_1):

$$b_1 = \frac{n\sum xy - \sum x\sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Dónde:

- x: Concentración de la solución estándar
- y: Respuesta de la solución estándar
- n: número de determinaciones o mediciones

Fórmula utilizada para el cálculo de la pendiente al origen (b_0):

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Dónde:

x: Concentración de la solución estándar

y: Respuesta de la solución estándar

n: número de determinaciones o mediciones

b. PRECISION DEL SISTEMA

Procedimiento:

- Se prepararon de acuerdo a la técnica de análisis 6 soluciones de estándar al 100% y se hicieron 6 determinaciones consecutivas en el equipo.
- Para la preparación de estas soluciones se tomó que nuestro 100% era equivalente 0.3000 g(mezcla de estándar positivo y negativo) a partir de esto las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} 0.3000 \text{ g} \text{ ————— } 100.0\% \\ x \text{ ————— } 5.0\% \\ x=0.0150 \text{ g} \end{array}$$

Se pesó 0.0150 g de estándar positivo (estándar 100%) y se completó el peso a 0.3000 g con el estándar negativo.

- Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación de las determinaciones obtenidas.

Fórmula usada para cálculo de la desviación estándar (S):

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Dónde:

y: Concentración de la solución estándar

n: número de determinaciones o mediciones

Fórmula usada para el cálculo del coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Dónde:

S: Desviación estándar

\bar{y} : Media de la concentración de la solución estándar

c. PRECISIÓN DEL METODO

Para la precisión del método se realizaron 6 determinaciones del estándar al 100% y 6 determinaciones de muestra de cada marca de margarina en estudio.

Procedimiento:

- Se prepararon de acuerdo a la técnica de análisis, 6 determinaciones del estándar (trioleína, trielaidina) al 100% de la concentración teórica. Esta solución fue preparada igual que en la precisión del sistema.
- Se prepararon 6 determinaciones de muestra, dividiendo una barra de margarina en seis partes iguales y se procedió a su tratamiento como se indica en el Anexo N°5
- Se procedió a realizar la lectura de cada una de las soluciones comenzando con un estándar y posteriormente 6 soluciones de muestra, hasta terminar la serie.

- Se procedió a calcular la desviación estándar y el coeficiente de variación de las determinaciones obtenidas.

Fórmula usada para cálculo de la desviación estándar (S):

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Dónde:

y: Concentración de la solución estándar

n: número de determinaciones o mediciones

Fórmula usada para el cálculo del coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Dónde:

S: Desviación estándar

\bar{y} : Media de la concentración de la solución estándar

d. PRECISION INTERMEDIA

Procedimiento:

- Se prepararon de acuerdo a la técnica de análisis, 6 determinaciones del estándar al 100% de la concentración teórica. Estas soluciones fueron preparadas igual q la precisión del sistema.
- Se prepararon 6 determinaciones muestra, dividiendo una barra de margarina en seis partes iguales y se procedió a su tratamiento como se indica en el anexo N° 5.
- Se realizó una determinación de cada solución alternando estándar y muestra, comenzando con un estándar, hasta terminar la serie.

Esta prueba se realizó por cada uno de dos analistas, utilizando como muestra el mismo lote de margarina, y se realizaron las determinaciones en 2 días

diferentes. Los datos del analista uno, día uno, fueron tomados de los resultados obtenidos en la precisión del método, para ser comparados con los datos del analista dos, día dos, que corresponden a los obtenidos en la precisión intermedia.

De igual manera para el ensayo de la precisión intermedia se aplicó el ensayo de Fisher para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis. Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación de las determinaciones obtenidas.

Fórmula usada para cálculo de la desviación estándar (S):

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Dónde:

y: Concentración de la solución estándar

n: número de determinaciones o mediciones

Fórmula usada para el cálculo del coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Dónde:

S: Desviación estándar

\bar{y} : Media de la concentración de la solución estándar

e. EXACTITUD (RECOBRO)

Procedimiento:

- Se prepararon 3 mezclas de estándar (trioleína, trielaidina) al 100% de la concentración teórica. Para la preparación de estas soluciones se tomó que

nuestro 100% era equivalente 0.3000 g (mezcla de estándar positivo y negativo) a partir de esto las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} 0.3000 \text{ g} \text{ ————— } 100.0\% \\ x \text{ ————— } 5.0\% \\ x = 0.0150 \text{ g} \end{array}$$

Se pesó 0.0150 g de estándar positivo (estándar 100%) y se completó el peso a 0.3000 g con el estándar negativo.

- Se prepararon por triplicado las siguientes soluciones de prueba, tomando en cuenta la concentración teórica en el producto terminado:

Matriz + estándar positivo al 80%

Para la preparación de estas soluciones se tomó que nuestro 100% era equivalente 0.3000 g (mezcla de estándar positivo y matriz) a partir de esto las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} 0.3000 \text{ g} \text{ ————— } 100.0\% \\ x \text{ ————— } 4.0\% \\ x = 0.0120 \text{ g} \end{array}$$

Se pesó 0.0120 g de estándar positivo (estándar 80.0%) y se completó el peso a 0.3000 g con la matriz.

Matriz + estándar positivo al 100%

Para la preparación de estas soluciones se tomó que nuestro 100% era equivalente 0.3000 g (mezcla de estándar positivo y matriz) a partir de esto las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} 0.3000 \text{ g} \text{ ————— } 100.0\% \\ x \text{ ————— } 5.0\% \\ x = 0.0150 \text{ g} \end{array}$$

Se pesó 0.0150 g de estándar positivo (estándar 100%) y se completó el peso a 0.3000 g con la matriz.

Matriz + estándar positivo al 120%

Para la preparación de estas soluciones se tomó que nuestro 100% era equivalente 0.3000 g (mezcla de estándar positivo y matriz) a partir de esto las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} 0.3000 \text{ g} \text{ ————— } 100.0\% \\ x \text{ ————— } 6.0\% \\ x = 0.0180 \text{ g} \end{array}$$

Se pesó 0.0180 g de estándar positivo (estándar 120%) y se completó el peso a 0.3000 g con matriz.

Se realizó una determinación de cada solución, de acuerdo a la siguiente secuencia:

- Estándar 1
- Muestra 80%
- Muestra 100%
- Muestra 120%

Hasta terminar las 3 series

Cálculos: se realizaron los cálculos para cada serie de muestras con referencia al estándar respectivo, comparando el valor real obtenido con el valor teórico esperado. Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación correspondiente, utilizando las fórmulas presentadas en precisión del método y linealidad.

Fórmula usada para cálculo de la desviación estándar (S):

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Dónde:

y: Concentración de la solución estándar

n: número de determinaciones o mediciones

Fórmula usada para el cálculo del coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Dónde:

S: Desviación estándar

\bar{y} : Media de la concentración de la solución estándar

La exactitud fue calculada como el porcentaje de recobro de la cantidad conocida del estándar positivo agregado a la matriz, tomando en cuenta el nivel de porcentaje utilizado.

4.4.5 ANALISIS DE MUESTRA Y ESTANDAR EN IR. (Ver Anexo N°5)

Parte I: Tratamiento de muestras de margarina ⁽¹⁴⁾

- Se tomó una cantidad de la muestra desde su empaque primario con una espátula y se colocó en un tubo de boca ancha de 50 mL.
- Se trató la muestra de la siguiente manera: se colocó el tubo de ensayo donde se encuentra la muestra en un baño de maría Precitherm y se controló con un termómetro que la temperatura se encuentre a $62^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta la fundición y separación de las fases.

- Se tomó una pequeña cantidad de muestra fundida y se colocó en la celda.
- Se procedió a leer en un espectrofotómetro IR a una longitud de onda de 966 cm^{-1} cada una de las muestras que serán analizadas.

Parte II: Tratamiento de los estándares.

- Se quebraron con cuidado, las ampollas que contenían los estándares y se extrajo con una jeringa de tuberculina un equivalente a $50\ \mu\text{L}$.
- Se procedió a pesar el estándar de Trioleina y Trielaidina según se requería en cada una de las pruebas que se llevaron a cabo en un tubo de bocas ancha.
- Se colocó el tubo con el estándar en un baño de maría Precitherm y se controló con un termómetro que la temperatura se encontrara entre $62^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta que se fundiera completamente.
- Se tomó una pequeña cantidad de muestra fundida y se colocó en la celda.
- Se procedió a leer en un espectrofotómetro IR a una longitud de onda de 966 cm^{-1} cada una de los estándares analizados.

Parte III: Obtención de los espectros Infrarrojos

- Se encendió el espectrofotómetro IR y la computadora.
- Se inició el programa IR-Solution.
- Se conectó el computador por medio del programa con el espectrofotómetro IR utilizando el comando "Measure", comando "Admin", inicializar. Dejar un tiempo de equilibrio de 15 minutos.
- Se permitió que el programa registrara las condiciones del equipo y que reconociera automáticamente el accesorio ATR.
- Se dejó correr un barrido de las condiciones iniciales del equipo con la unidad ATR armada sin muestra como sigue: utilizando el comando "Measure" y presionar "BKG" para obtener el espectro blanco (Background).

- Se tomó una pequeña cantidad de la muestra/estándar fundida.
- Se colocó la muestra distribuida uniformemente en el cristal de la celda y se acopló a la unidad ATR del equipo infrarrojo Shimadzu IR-Affinity.
- Se analizaron las muestras presionando el comando "Measure", se colectó la información de la muestra en el espacio "2comment" y se presionó en "sample" para obtener el espectro correspondiente para identificar la muestra de los 4000 a los 500 cm^{-1} .
- Se limpió la celda con un pañuelo suave y luego con un algodón impregnado de alcohol.
- Se compararon los espectros obtenidos con el estándar positivo y negativo recabado (ver procedimiento parte II).
- Se observó que si existe la presencia de la deformación del enlace C=C del isómero trans por la flexión C-H fuera del plano que aparece cercano a los 966 cm^{-1} .

Parte IV: Cuantificación de grasas trans

- Después del tratamiento de muestras y estándares y sus respectivas determinaciones en el equipo de Espectrofotometría Infrarroja Shimadzu IR-Affinity se procedió al cálculo utilizando el software IR Solution de Shimadzu, de la siguiente manera: arrastrando cada uno de los data de cada espectro obtenido hacia la tabla de cuantificación con su respectiva curva de calibración de estándares dada por el software, obteniendo así los resultados de la concentración de grasas trans en margarina.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

V. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Para realizar la propuesta de validación del método de espectroscopia infrarroja para la cuantificación de grasas trans en margarina basado en la metodología oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), el cual se adecuó a las condiciones del Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Se inició con una investigación bibliográfica, consultando libros oficiales y no oficiales, documentos, internet para la recopilación de toda la información de interés, generalidades de validación de métodos analíticos, guías metodológicas para validar, documentos a realizar en la validación de un método analítico. A continuación se muestran los resultados.

5.1 DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

En la tabla N° 3 se muestra el intervalo de concentración encontrado (mg/mL) de los estándares Trioleina como estándar negativo y el de Trielaidina como estándar positivo, así mismo la intensidad en absorbancia, las cuales corresponden a los principales ácidos grasos trans presentes en los estándares utilizados. En el Anexo N°6, se encuentran los cálculos para determinar la linealidad.

Tabla N° 3. Tabla de resultados de la linealidad del método

N°	Concentración % (X)	Intensidad de la señal Abs (y)	x ²	y ²	xy
1	0.0	0.100	0.00	0.010	0.000
2	0.5	0.107	0.25	0.011	0.054
3	1.0	0.105	1.00	0.011	0.105
4	5.0	0.130	25.00	0.017	0.650
5	5.0	0.145	25.00	0.021	0.725
6	10.0	0.189	100.00	0.036	1.890
7	20.0	0.296	400.00	0.088	5.920
8	30.0	0.389	900.00	0.151	11.670
9	40.0	0.451	1600.00	0.203	18.040
10	50.0	0.557	2500.00	0.310	27.850
11	50.0	0.544	2500.00	0.296	27.200
Σ	211.5	3.013	8051.25	1.155	94.10
Σ²	44732.3	9.078			
N	11				
Promedio		0.274			

- **Pendiente (b₁):** es igual a 0.009, el coeficiente b₁ es la pendiente de la recta: el cambio medio que se produce con las absorbancias de los estándares (y) por cada una de las concentraciones de estándares (x).
- **Ordenada al origen (b₀):** es igual a 0.099, la ordenada al origen nos indica donde corta la función lineal y que tan cercano al origen es el rango lineal.
- **Coefficiente de determinación (r²):** es igual 0.997 lo que significa que el 99.7% de la variación de la variable dependiente (absorbancia) se explica por la variable independiente (concentración).
- **Criterio de aceptación:** el coeficiente de determinación r² es ≥ 0.98.

El valor del coeficiente de determinación r² obtenido indica que el 99.705 de la variación de la variable dependiente se explica por la variable independiente. Lo que indica un muy buen grado de relación entre la variable dependiente e independiente, por lo que existe una alta probabilidad de correlación.

A partir de los datos anteriores se obtuvo la curva de calibración (Ver Anexo N°7). Con el fin de determinar el rango lineal, se realizó un gráfico de concentración

versus respuesta, que se conoce como Función Respuesta normalmente llamada curva de calibración. Se estableció con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y las diferentes concentraciones de analito de valor teórico conocido cubriendo así el intervalo de trabajo.

En este sentido se abarcaron valores desde el cero y valores superiores al valor de interés. El número de puntos a analizar fueron establecidos tomando como base la determinación total de ácidos grasos trans por espectroscopia infrarroja.

Luego de realizar el grafico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal.

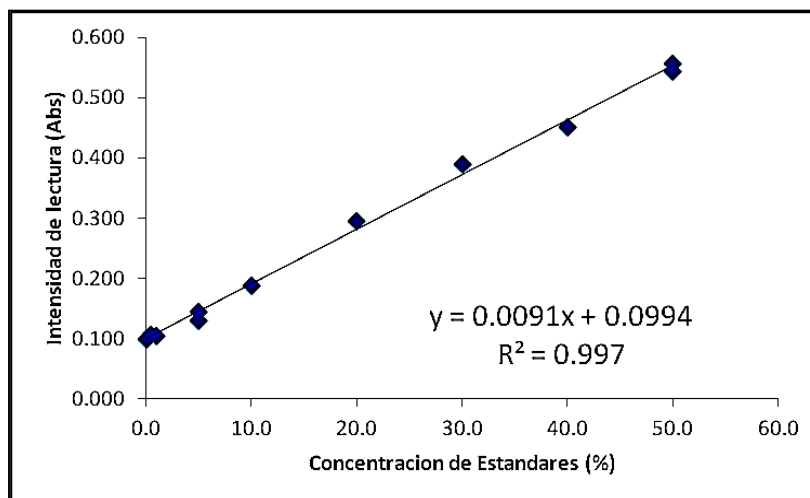


Figura N°6. Recta de regresión ajustada (Estándares Trioleina como estándar negativo y Trielaidina como estándar positivo)

- Se observa que la recta de regresión del gráfico, se ajusta a una línea recta cuya ecuación es $y=0.0091x + 0.0994$ ($y=mx+b$)
- Se observa que el resultado de coeficiente de variación (CV) de regresión fue igual a 3.8464.
- No se incluye cero en la regresión lineal.

- **Discusión de los resultados de linealidad del método**

Los resultados del estudio de linealidad del método realizado muestra un coeficiente de determinación superior al exigido por la guía de validación de métodos de análisis del consejo nacional de ciencia y tecnología CONACYT, este fue de $r^2=0.997$ (criterio de aceptación r^2 debe ser mayor o igual a 0.98), lo cual demuestra con el valor del coeficiente de determinación obtenido es cercano a la unidad, la existencia de correlación, así como el grado de relación entre las variables concentración y respuesta detectada por el equipo empleado. También el coeficiente de variación fue inferior al normado como máximo para este indicador: 3.84% donde el criterio de aceptación es de menor o igual a 5%, ambos son considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. El valor obtenido del CV permite demostrar que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. Se demuestra con los resultados la linealidad del método propuesto para la cuantificación de ácidos grasos trans en margarina.

5.2 DETERMINACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA

Se prepararon 6 estándares al 100.0% de acuerdo a la técnica de análisis para determinar la precisión del sistema. Las 6 soluciones de estándar se leyeron en el equipo consecutivamente, posteriormente se calculó la desviación estándar para las seis determinaciones.

Los resultados obtenidos indican que el sistema es preciso, ya que el coeficiente de variación dio abajo del 5%, que es lo que la guía especifica como máximo valor aceptable.

El resultado del coeficiente de variación (CV) fue de 1.75%

5.3 DETERMINACION DE LA PRECISION DEL MÉTODO

Para el estudio de la precisión se siguió el modelo de repetibilidad con el empleo de 6 réplicas de estándar y muestra.

Con ellas se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

- **Precisión del método para la Margarina Dany**

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado para margarina Dany aparece reportado en la tabla N°4. En el estudio de repetibilidad realizado el coeficiente de variación fue de 2.45% en analista 1.

Tabla N°4. Tabla de resultados de la precisión del método para Margarina Dany

Replicas	A (%)	A² (%)
1	13.631	1.86 x10 ²
2	13.853	1.92 x10 ²
3	13.458	1.81 x10 ²
4	13.596	1.85 x10 ²
5	13.014	1.69 x10 ²
6	13.062	1.71 x10 ²
Sumatoria	80.614	1083.66
Promedios	13.44	
S	0.33	
CV	2.45	

El coeficiente de variación (CV) de las respuestas es igual a 2.45% para analista 1 lo que indica una buena sensibilidad por lo que el sistema es preciso. Para ver cálculos referirse al Anexo N°8 y la tendencia del grafico de la precisión del método de margarina Dany ver Anexo N°9.

- **Precisión del método para la Margarina Cremy**

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado para margarina Cremy aparece reportado en la tabla N°5. En el estudio de repetibilidad realizado el coeficiente de variación fue de 2.76% para analista 1.

Tabla N°5. Tabla de resultados de la precisión del método para Margarina Cremy

Replicas	A (%)	A ² (%)
1	31.699	1.00x10 ³
2	30.522	0.93x10 ³
3	30.814	0.95x10 ³
4	30.258	0.91x10 ³
5	29.261	0.85x10 ³
6	29.808	0.88x10 ³
Total ΣY	182.362	5546.1912
Ȳ	30.39	
S	0.84	
CV	2.76	

El coeficiente de variación de las respuestas es igual a 2.76% para analista 1, lo que indica una buena sensibilidad por lo que el sistema es preciso. Para ver cálculos referirse al Anexo N°8. Para ver la tendencia del grafico de la precisión del método de margarina Cremy ver Anexo N°11.

- Precisión del método para la Margarina Suly

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado para margarina Suly aparece reportado en la tabla N°6, En el estudio de repetibilidad realizado el coeficiente de variación fue de 1.75% para analista 1.

Tabla N°6 Tabla de resultados de la precisión del método para Margarina Suly

Replicas	A (%)	A ² (%)
1	16.863	2.84x10 ²
2	16.949	2.87x10 ²
3	16.526	2.73x10 ²
4	16.491	2.72x10 ²
5	16.155	2.61x10 ²
6	16.480	2.72x10 ²
Total ΣY	99.464	1649.2656
Ȳ	16.58	
S	0.29	
CV	1.75	

El coeficiente de variación de las respuestas es igual a 1.75% para analista 1 lo que indica una buena sensibilidad por lo que el sistema es preciso. Para ver cálculos referirse al Anexo N°8.

Para ver la tendencia del gráfico de la precisión del método de margarina Suly ver Anexo N°13.

5.4 DETERMINACION DE LA PRECISION INTERMEDIA DEL MÉTODO

Para el estudio de la precisión intermedia del método se siguió el modelo de repetibilidad con el empleo de 6 réplicas de estándares y muestras. Con ellas se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Para el ensayo de la precisión intermedia del método se emplearon 2 analistas en 2 días diferentes, los datos utilizados para analista 1 son los datos que resultaron de la precisión del método. Se aplicó el ensayo de Fisher para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis.

- Precisión intermedia del método para la Margarina Dany

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado para margarina Dany aparece reportado en la tabla N°7. En el estudio de repetibilidad realizado el coeficiente de variación fue de 2.45% en analista 1 y 3.33 % para analista 2.

Tabla N°7. Tabla de resultados de la precisión intermedia del método para Margarina Dany

Replicas	ANALISTA 1 (%)	ANALISTA 2 (%)	(ANALISTA) ² (%)	(ANALISTA) ² (%)
1	13.631	26.441	1.86x10 ²	6.99x10 ²
2	13.853	26.004	1.92x10 ²	6.7x10 ²
3	13.458	26.018	1.81x10 ²	6.76x10 ²
4	13.596	26.290	1.85x10 ²	6.91x10 ²

Tabla N°7. Continuación

Replicas	ANALISTA 1 (%)	ANALISTA 2 (%)	(ANALISTA) ² (%)	(ANALISTA) ² (%)
5	13.014	26.112	1.69x10 ²	6.81x10 ²
6	13.062	24.159	1.71x10 ²	5.83x10 ²
Sumatoria	80.614	155.02	1083.66	4008.93
Promedios	13.44	25.84		
S	0.33	0.86		
CV	2.45	3.33		

El coeficiente de variación de las respuestas es igual a 2.45% para analista 1 y 3.33% para analista 2, lo que indica una buena sensibilidad por lo que el sistema es preciso. Para ver cálculos referirse al Anexo N°8 y la tendencia del gráfico de la precisión intermedia del método de margarina Dany ver Anexo N°10.

El resultado del estudio de precisión intermedia del método desarrollado para margarina Dany aparece reportado en la tabla N°8. En el estudio de la Prueba de Fisher el valor de F calculado obtenido en el estudio de precisión intermedia realizado fue menor que el valor tabulado, para un 95 % de confianza, para cada uno de los niveles estudiados.

Tabla N° 8. Tabla de resultados de prueba F para varianzas de dos muestras margarina Dany

Descripción	Variable 1	Variable 2
Promedio (%)	13.4357	25.8373
Varianza	0.1112	0.7044
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	0.1578	
P(F<=f) una cola	0.0319	
Valor crítico para F (una cola)	0.1980	

- Cada analista realizó 6 determinaciones, se obtuvo una F de tabla igual a 3.18 y una F experimental de 0.1578

Los valores que se obtienen en el estudio de precisión intermedia, de la prueba de Fisher, demostraron que no existían diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, ya que los valores de F calculados es menor que la F tabulada (Tabla N° 8). Los resultados de este estudio demostraron que el método era reproducible y no existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis, analistas y días, lo que evidencia la precisión intermedia del método en cuestión.

- **Precisión Intermedia del método para la Margarina Cremo**

El resultado del estudio de precisión intermedia del método desarrollado para margarina Cremo aparece reportado en la tabla N°9. En el estudio de repetibilidad realizado el coeficiente de variación fue de 2.76% para analista 1 y 2.66 % para analista 2.

Tabla N°9. Tabla de resultados de la precisión intermedia del método para Margarina Cremo

REPLICAS	ANALISTA 1 (%)	ANALISTA 2 (%)	(ANALISTA) ² (%)	(ANALISTA) ² (%)
1	31.699	23.575	1.00x10 ³	0.555x10 ³
2	30.522	22.965	0.93x10 ³	0.527x10 ³
3	30.814	23.480	0.95x10 ³	0.551x10 ³
4	30.258	23.656	0.91x10 ³	0.559x10 ³
5	29.261	23.406	0.85x10 ³	0.547x10 ³
6	29.808	24.843	0.88x10 ³	0.617x10 ³
Total ΣY	182.362	141.93	5546.1912	3359.1041
Ŷ	30.39	23.65		
S	0.84	0.63		
CV	2.76	2.66		

El coeficiente de variación de las respuestas es igual a 2.76% para analista 1 y 2.66% para analista 2, lo que indica una buena sensibilidad por lo que el sistema es preciso. Para ver cálculos referirse al Anexo N°8.

Para ver la tendencia del grafico de la precisión intermedia del método de margarina Cremy ver Anexo N°12.

El resultado del estudio de precisión intermedia del método desarrollado para margarina Cremy aparece reportado en la tabla N°10, En el estudio el valor de F calculado obtenido en el estudio de precisión intermedia realizado fue menor que el valor tabulado, para un 95 % de confianza, para cada uno de los niveles estudiados.

Tabla N° 10. Tabla de resultados de prueba F para varianzas de dos muestras margarina Cremy

Descripción	Variable 1	Variable 2
Media	30.3937	23.6542
Varianza	0.7083	0.3973
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	1.7827	
P(F<=f) una cola	0.2706	
Valor crítico para F (una cola)	5.0503	

- Se uso n= 6, porque cada analista realizó 6 determinaciones.
- Se obtuvo una F de tabla igual a 3.18.

Los valores que se obtienen en el estudio de precisión intermedia, de la prueba de Fisher, demostraron que no existían diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, ya que los valores de F calculados es menor que la F tabulada (Tabla N° 10). Los resultados de este estudio demostraron que el método era reproducible y no existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis, analistas y días, lo que evidencia la precisión del método en cuestión.

- **Precisión Intermedia del método para la Margarina Suly**

El resultado del estudio de precisión intermedia del método desarrollado para margarina Suly aparece reportado en la tabla N°11, En el estudio de repetibilidad realizado el coeficiente de variación fue de 1.75% para analista 1 y 2.52% para analista 2.

Tabla N°11. Tabla de resultados de la precisión intermedia del método para Margarina Suly

REPLICAS	ANALISTA 1 (%)	ANALISTA 2 (%)	(ANALISTA) ² (%)	(ANALISTA) ² (%)
1	16.863	21.612	2.84x10 ²	4.67x10 ²
2	16.949	21.296	2.87x10 ²	4.53x10 ²
3	16.526	21.700	2.73x10 ²	4.70x10 ²
4	16.491	20.605	2.72x10 ²	4.24x10 ²
5	16.155	20.676	2.61x10 ²	4.27x10 ²
6	16.480	20.522	2.72x10 ²	4.21x10 ²
Total ΣY	99.464	126.41	1649.2656	2664.7036
Ŷ	16.58	21.07		
S	0.29	0.53		
CV	1.75	2.52		

El coeficiente de variación de las respuestas es igual a 1.75% para analista 1 y 2.52% para analista 2, lo que indica una buena sensibilidad por lo que el sistema es preciso. Para ver cálculos referirse al Anexo N°8.

Para ver la tendencia del gráfico de la precisión intermedia del método de margarina Suly ver Anexo N°14.

El resultado del estudio de precisión intermedia del método desarrollado para margarina Suly aparece reportado en la tabla N°12, En el estudio el valor de F calculado obtenido en el estudio de precisión intermedia realizado fue menor que el valor tabulado, para un 95 % de confianza, para cada uno de los niveles estudiados.

Tabla N° 12. Tabla de resultados de prueba F para varianzas de dos muestras margarina Suly

Descripción	Variable 1	Variable 2
Media	16.5773	21.0685
Varianza	0.0835	0.2827
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	0.2955	
P(F<=f) una cola	0.1035	
Valor crítico para F (una cola)	0.1980	

- Se usó n= 6, porque cada analista realizó 6 determinaciones.
- Se obtuvo una F de tabla igual a 3.18.

Los valores que se obtienen en el estudio de precisión intermedia, de la pruebas de Fisher, demostraron que no existían diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, ya que el valor de F calculado es menor que la F tabulada (tabla N° 12). Los resultados de este estudio demostraron que el método era reproducible y no existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis, analistas y días, lo que evidencia la precisión intermedia del método en cuestión.

5.5 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

A. Repetibilidad del método para la marca Margarina Dany

En el estudio de la repetibilidad realizado en margarina Dany a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (2.45 %) Tabla N°13, lo que demostró la buena precisión del método según el límite para los métodos de espectroscopia infrarroja para cuantificación de ácidos grasos trans en margarina: $CV \leq 5.0\%$, lo cual evidencia que el método es repetible en las condiciones del laboratorio de aguas de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Tabla N°13. Tabla de resultados de repetibilidad del método para Margarina Dany

Análisis de cada Replica	Resultado (%)	$(y - \bar{y})^2$
1	13.631	3.8160×10^{-2}
2	13.853	1.7421×10^{-1}
3	13.458	4.900×10^{-4}
4	13.596	2.571×10^{-2}
5	13.014	1.7780×10^{-1}
6	13.062	1.3960×10^{-1}
Sumatoria	80.614	5.5595×10^{-1}
Promedio (\bar{Y})	13.436	
S	0.333	
CV	2.45	

Para ver los cálculos de la repetibilidad del método para margarina Dany ver Anexo N°15.

B. Repetibilidad del método para la marca Margarina Cremy

En el estudio de la repetibilidad realizado en margarina Cremy a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (2.76 %) tabla N°14, lo que demostró la buena precisión del método según el límite para los métodos de espectroscopia infrarroja para cuantificación de ácidos grasos trans en margarina: $CV \leq 5.0\%$, lo cual evidencia que el método es repetible en las condiciones del laboratorio de aguas de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Tabla N°14. Tabla de resultados de la repetibilidad del método para Margarina Cremy

Análisis de cada replica	y (%)	$(y - \bar{y})^2$
1	31.699	1.704×10^0
2	30.522	1.647×10^{-2}
3	30.814	1.766×10^{-1}
4	30.258	1.841×10^{-2}
5	29.261	1.283×10^0

Tabla N°14. Continuación

Análisis de cada replica	y (%)	(y- \bar{y}) ²
6	29.808	3.430x10 ⁻¹
Total ΣY	182.362	3.54138
Promedio (\bar{Y})	30.39	
S	0.84	
CV	2.76	

Para ver los cálculos de la repetibilidad del método para margarina Cremy ver Anexo N°15.

C. Repetibilidad del método para la Margarina Suly

En el estudio de la repetibilidad realizado en margarina Suly a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (1.7%) tabla N°15, lo que demostró la buena precisión del método según el límite para los métodos de espectroscopia infrarroja para cuantificación de ácidos grasos trans en margarina: $CV \leq 5.0\%$, lo cual evidencia que el método es repetible en las condiciones del laboratorio de aguas de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Tabla N°15. Tabla de resultados de la repetibilidad del método para Margarina Suly

N°	y (%)	(y- \bar{Y}) ²
1	16.863	8.161x10 ⁻²
2	16.949	1.381x10 ⁻¹
3	16.526	2.635x10 ⁻³
4	16.491	7.453x10 ⁻³
5	16.155	1.784x10 ⁻¹
6	16.480	9.474x10 ⁻³
Total ΣY	99.464	4.1766x10⁻¹
Promedio (\bar{Y})	16.58	
S	0.29	
CV	1.75	

Para ver los cálculos de la repetibilidad del método para margarina Suly ver Anexo N°15.

5.6 EXACTITUD DEL MÉTODO

En la tabla N° 16 se presentan los valores obtenidos en la determinación de la exactitud del método, para ellos se llevaron a cabo 9 determinaciones del estándar, 3 por cada nivel de concentración (80%, 100% y 120%)

Tabla N°16. Tabla de resultados de la exactitud del método

Replica	Blanco Absorbancia	Valor Blanco g/100g	Adición %	Recuperación Absorbancia	Resultado g/100g	Recuperación g/100g	Y % de recuperación	Y ²
1	0.100	0.00	4.00	0.136	4.022	4.022	100.55	0.59
2	0.100	0.00	4.00	0.136	4.022	4.022	100.55	0.59
3	0.100	0.00	4.00	0.134	3.802	3.802	95.05	39.18
4	0.100	0.00	4.00	0.138	4.242	4.242	106.04	22.37
5	0.100	0.00	4.00	0.135	3.912	3.912	97.80	12.34
6	0.100	0.00	4.00	0.137	4.132	4.132	103.30	3.93
7	0.100	0.00	5.00	0.146	5.121	5.121	102.42	1.22
8	0.100	0.00	5.00	0.144	4.901	4.901	98.02	10.84
9	0.100	0.00	5.00	0.146	5.121	5.121	102.42	1.22
10	0.100	0.00	5.00	0.145	5.011	5.011	100.22	1.20
11	0.100	0.00	5.00	0.147	5.231	5.231	104.62	10.90
12	0.100	0.00	5.00	0.144	4.901	4.901	98.02	10.84
13	0.100	0.00	6.00	0.156	6.220	6.220	103.66	5.51
14	0.100	0.00	6.00	0.155	6.110	6.110	101.83	0.27
15	0.100	0.00	6.00	0.155	6.110	6.110	101.83	0.27
16	0.100	0.00	6.00	0.156	6.220	6.220	103.66	5.51
17	0.100	0.00	6.00	0.155	6.110	6.110	101.83	0.27
18	0.100	0.00	6.00	0.155	6.110	6.110	101.83	0.27
Sumatoria		0.00					1823.66	127.30

- Las réplicas analizaron fueron n = 18,
- El valor obtenido de Raíz de n fue igual a 2.24
- Se obtuvo una Media de porcentaje de recuperación “y” igual a 101.31
- La Desviación estándar(S) obtenida fue igual a 2.74
- El coeficiente de variación (CV) que resulto fue igual a 2.70%

- El intervalo de confianza (IC) de la media poblacional es igual a $101.31\% \pm 1.36$
- El rango de porcentaje de recuperación es igual a $99.95\% - 102.67\%$
- El resultado de la exactitud del método debe incluir el 100%

Los cálculos de la exactitud del método son desarrollados en el Anexo N°16.

Se muestra la preparación de 18 muestras para realizar la prueba de recobro, variando en éste el porcentaje de los estándares Trioleina como estándar negativo y el de Trielaidina como estándar positivo, el procedimiento se lo hace por triplicado y se hace una lectura por cada uno. Con base en los resultados obtenidos en cuanto a promedio y coeficiente de variación, se concluye que el método es exacto dentro de las concentraciones evaluadas (4.0% al 6.0%).

5.7 RESUMEN DE RESULTADOS

Tabla N°17. Tabla resumen de resultados de validación del método analítico para la cuantificación de grasas trans en margarina.

PARÁMETRO	DETERMINACION		RESULTADOS
LINEALIDAD	Concentración del estándar	Número de Replicas	<ul style="list-style-type: none"> - Rango lineal 0.5%-50.0% - Análisis de regresión que demuestre tener: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Coeficiente de determinación (r^2): 0.997 ✓ Desviada al origen: 0.099% Dictamen: CUMPLE
	0.0%	3	
	0.5%	3	
	1.0%	3	
	5.0%	3	
	10.0%	3	
	20.0%	3	
	30.0%	3	
	40.0%	3	
	50.0%	3	
PRECISION DEL SISTEMA	6 determinaciones consecutivas de la preparación del estándar al 100%		Coeficiente de variación (CV):1.75 Dictamen: CUMPLE
PRECISION DEL METODO (CON PRODUCTO)	6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica		Coeficiente de variación de respuestas: <ul style="list-style-type: none"> - Margarina Dany: 2.48 - Margarina Cremy: 2.77 - Margarina Suly: 1.75 Dictamen: CUMPLE


Tabla N° 17. Continuación

PARÁMETRO	DETERMINACION	RESULTADOS
EXACTITUD (RECOBRO)	<p>Cantidades del estándar, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método), para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia.</p> <p>La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada.</p> <p>Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración)</p> <p>3 determinaciones de estándar al 100%</p>	<p>- Porcentaje de recobro: del 99.95% al 102.67%</p> <p>- Coeficiente de variación: 2.70</p> <p>-Desviación estándar: 2.74</p> <p>-Media de recuperación: 101.31%</p> <p>Dictamen: CUMPLE</p>
PRECISION INTERMEDIA	<p>Cada uno de 2 analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes</p> <p>Prueba de Fisher: La F calculada debe ser similar a la F tabulada,</p>	<p>Sumatoria de CV de analista 1 y analista 2.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Margarina Dany: 5.73 - Margarina Cremo: 5.43 - Margarina Suly: 7.26 <p>Prueba de Fisher: F de tabla=3.18 F calculada:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Margarina Dany: 0.1578 - Margarina Cremo: 1.7827 - Margarina Suly: 0.2954 <p>Se observa que la F calculada es menor que la F tabulada, por lo tanto no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días.</p> <p>Dictamen: CUMPLE</p>

Cumplidas las especificaciones de las pruebas de: Linealidad, Precisión del Sistema, Precisión del método, Precisión intermedia y Exactitud, queda establecido que el método analítico para la cuantificación de ácidos grasos trans en margarina utilizando el método oficial para cuantificar grasas trans de la Asociación Americana de Químicos Analistas (AOAC), funciona correctamente cuando se aplican a muestras que contienen ese tipo de matriz, por lo que, se concluye que este método, queda VALIDADO y está apto para ser utilizado.

5.8 ELABORACION DE PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados, se procedió a la elaboración de Protocolo de Validación.

	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 1 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

Elaborado por:


Firma:	
Nombre:	Aymee Caballero
Cargo:	Analista
Fecha:	Febrero 2015

Revisado por:

Firma:	
Nombre:	Iris Blanco
Cargo:	Analista
Fecha:	Febrero 2015

Autorizado por:

Firma:	
Nombre:	Lic. Henry Hernández
Cargo:	Asesor
Fecha:	Febrero 2015

	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 2 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

INDICE

1.0 Introducción

2.0 Fundamento de validación o antecedentes

3.0 Objetivo

4.0 Resultado de la evaluación de riesgos


5.0 Equipos utilizados

6.0 Esquema de validación del método analítico

7.0 Conclusiones y dictamen de validación

8.0 Bibliografía

9.0 Anexo A

	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 3 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015


1.0 Introducción

La Validación de Métodos Analíticos permite una obtención exhaustiva de pruebas demostrativas que están debidamente documentadas, en donde, un método analítico de Control de Calidad debe ser lo suficientemente fiable como para poder producir el resultado previsto dentro del intervalo definido. Por lo que se procedió a la Validación del Método Analítico.

2.0 Fundamento de validación o antecedentes

Al realizar una Validación de un Método Analítico, se requiere el plantear ciertas ventajas que presenta su desarrollo:

- Proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.
- Permitir un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento.
- Disminución en el número de fallas y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costos asociados.
- Optimización del método, mejorando las características de practicabilidad y posibilidades de automatización.

	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 4 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

3.0 Evaluación de riesgos

En la Validación del Método se tomarán en cuenta ciertos factores como las condiciones de temperatura en el área de análisis y tiempo de preparación de la muestra.


4.0 Objetivo

Establecer la evidencia documentada de la Validación prospectiva del método analítico, el cual, debe ser capaz de producir consistentemente los mismos resultados, siendo precisos, selectivos y lineales, cumpliendo con las especificaciones de calidad.

5.0 Equipos

Los equipos utilizados en este estudio fueron los siguientes:

- Equipo de Espectrofotometría Infrarroja Shimadzu IR-Affinity


	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 5 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

Materiales

- Unidad de Reflectancia Total Atenuada (ATR)
- Pipeta serológica de boca ancha
- Goteros
- Baño de maría Precitherm PFV
- Termómetro
- Tubos de boca ancha de 50 mL
- Probetas de 10 mL
- Celda de bromuro de potasio (KBr)
- Jeringa de tuberculina
- Gradilla
- Espátulas
- Micropipeta


Reactivos

- Estándares: trioleina como estándar negativo, trielaidina como estándar positivo.
- Etanol


	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 6 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

6.0 Esquema de validación del método analítico

PARÁMETRO	DETERMINACION		ESPECIFICACIONES
1.LINEALIDAD	Concentraciones del estándar	Número de determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rango lineal ➤ Análisis de regresión que demuestre: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coeficiente de determinación (r^2) : ≥ 0.98 ▪ Desviada al origen: $\leq 5.0\%$
	Valoración		
	0.0%	3	
	0.5%	3	
	1.0%	3	
	5.0%	3	
	10.0%	3	
	20.0%	3	
	30.0%	3	
	40.0%	3	
50.0%	3		
2. PRECISION DEL SISTEMA	6 determinaciones consecutivas de la preparación del estándar al 100%		Coeficiente de variación en cuanto a: Factor de respuesta : $\leq 5.0\%$
3.PRECISION DEL METODO (CON PRODUCTO)	6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica		Coeficiente de variación de: - Principios activos (concentración de muestra): $\leq 5.0\%$

	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 7 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

PARÁMETRO	DETERMINACION	ESPECIFICACIONES
4.EXACTITUD (RECOBRO)	<p>Cantidades del estándar, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método), para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia.</p> <p>La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada.</p> <p>Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración)</p> <p>3 determinaciones de estándar al 100%</p>	<p>- Porcentaje de recobro: del 97.0% al 105.0%</p> <p>- Coeficiente de variación: $\leq 5.0\%$</p> <p>- Desviación estándar: $\leq 5.0\%$</p>
5. PRECISION INTERMEDIA	<p>Cada uno de 2 analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes</p> <p>Prueba de fisher</p> <p>Comparar La F calculada con la F tabulada,</p>	<p>Coeficiente de variación: - $\leq 5.0\%$</p>

	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 8 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

7.0 Conclusión y dictamen de validación


Cumplidas las especificaciones de las pruebas de: Linealidad, Precisión del Sistema, Precisión del método, Precisión intermedia y Exactitud queda establecido que el método analítico para la Cuantificación de grasas trans en margarina, funciona correctamente, por lo que, se concluye que este método, queda VALIDADO y está apto para ser utilizado.

DICTAMEN: CONFORME

Declarándole: VALIDO para su utilización.

8.0 Bibliografía

- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH, Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005.
- Guía de Validación de Métodos Analíticos (editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C.)
- Norma Codex alimentarius stan 32-1981 (Rev 1-1989); Norma de CODEX para la Margarina.


	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 9 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

9.0 Anexo A

ANALISIS DE MUESTRA Y ESTANDAR EN IR

Parte I: Tratamiento de muestras de margarina ⁽¹⁴⁾

- Se tomó una cantidad de la muestra desde su empaque primario con una espátula y se colocó en un tubo de boca ancha de 50 mL.
- Se trató la muestra de la siguiente manera: se colocó el tubo de ensayo donde se encuentra la muestra en un baño de maría Precitherm y se controló con un termómetro que la temperatura se encuentre a $62^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta la fundición y separación de las fases.
- Se tomó una pequeña cantidad de muestra fundida y se colocó en la celda.
- Se procedió a leer en un espectrofotómetro IR a una longitud de onda de 966 cm^{-1} cada una de las muestras que serán analizadas.


	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 10 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

Parte II: Tratamiento de los estándares.


- Se quebraron con cuidado, las ampollas que contenían los estándares y se extrajo con una jeringa de tuberculina un equivalente a 50 µL.
- Se procedió a pesar el estándar de Trioleina y Trielaidina según se requería en cada una de las pruebas que se llevaron a cabo en un tubo de bocas ancha.
- Se colocó el tubo con el estándar en un baño de maría Precitherm y se controló con un termómetro que la temperatura se encontrara entre $62^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta que se fundiera completamente.
- Se tomó una pequeña cantidad de muestra fundida y se colocó en la celda.
- Se procedió a leer en un espectrofotómetro IR a una longitud de onda de 966 cm^{-1} cada una de los estándares analizados.

Parte III: Obtención de los espectros Infrarrojos

- Se encendió el espectrofotómetro IR y la computadora.
- Se inició el programa IR-Solution.
- Se conectó el computador por medio del programa con el espectrofotómetro IR utilizando el comando “Measure”, comando “Admin”, inicializar. Dejar un tiempo de equilibrio de 15 minutos.
- Se permitió que el programa registrara las condiciones del equipo y que reconociera automáticamente el accesorio ATR.

	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 11 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

- Se dejó correr un barrido de las condiciones iniciales del equipo con la unidad ATR armada sin muestra como sigue: utilizando el comando “Measure” y presionar “BKG” para obtener el espectro blanco (Background).
- Se tomó una pequeña cantidad de la muestra/estándar fundida.
- Se colocó la muestra distribuida uniformemente en el cristal de la celda y se acopló a la unidad ATR del equipo infrarrojo Shimadzu IR-Affinity.
- Se analizaron las muestras presionando el comando “Measure”, se colectó la información de la muestra en el espacio 2coment” y se presionó en “sample” para obtener el espectro correspondiente para identificar la muestra de los 4000 a los 500 cm^{-1} .
- Se limpió la celda con un pañuelo suave y luego con un algodón impregnado de alcohol.
- Se compararon los espectros obtenidos con el estándar positivo y negativo recabado (ver procedimiento parte II).
- Se observó que si existe la presencia de la deformación del enlace C=C del isómero trans por la flexión C-H fuera del plano que aparece cercano a los 966 cm^{-1} .


	PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 12 de 12
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

Parte IV: Cuantificación de grasas trans

Después del tratamiento de muestras y estándares y sus respectivas determinaciones en el equipo de Espectrofotometría Infrarroja Shimadzu IR-Affinity se procedió al cálculo utilizando el software IR Solution de Shimadzu, de la siguiente manera: arrastrando cada uno de los data de cada espectro obtenido hacia la tabla de cuantificación con su respectiva curva de calibración de estándares dada por el software, obteniendo así los resultados de la concentración de grasas trans en margarina.

5.9 ELABORACION DE REPORTE DE VALIDACIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados, se procedió a la elaboración de Reporte de Validación.

	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 1 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

Elaborado por:


Firma:	
Nombre:	Aymee Caballero
Cargo:	Analista
Fecha:	Febrero 2015

Revisado por:

Firma:	
Nombre:	Iris Blanco
Cargo:	Analista
Fecha:	Febrero 2015

Autorizado por:

Firma:	
Nombre:	Lic. Henry Hernández
Cargo:	Asesor
Fecha:	Febrero 2015

	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 2 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

INDICE

1.0 Introducción

2.0 Resultado de la evaluación de riesgos


3.0 Equipos utilizados

4.0 Esquema de validación del método analítico

5.0 Resultados de validación del método analítico

6.0 Conclusiones y dictamen de validación

7.0 Bibliografía

	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 3 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

1.0 Introducción

La Validación de Métodos Analíticos permite una obtención exhaustiva de pruebas demostrativas que están debidamente documentadas, en donde, un método analítico de Control de Calidad debe ser lo suficientemente fiable como para poder producir el resultado previsto dentro del intervalo definido. Por lo que se procedió a la Validación del Método Analítico.


2.0 Resultado de la evaluación de riesgos

En la Validación del Método se tomaron en cuenta ciertos factores como las condiciones de temperatura en el área de análisis y tiempo de preparación de la muestra. Dichos factores no interfirieron en los resultados finales de la Validación.

3.0 Equipos


Los equipos utilizados en este estudio fueron los siguientes:

- Equipo de Espectrofotometría Infrarroja Shimadzu IR-Affinity


	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 4 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

4.0 Esquema de validación del método analítico

PARÁMETROS	DETERMINACION		ESPECIFICACIONES
1.LINEALIDAD	Concentraciones del estándar	Número de determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rango lineal ➤ Análisis de regresión que demuestre: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coeficiente de determinación (r^2) : ≥ 0.98 ▪ Desviada al origen: $\leq 5.0\%$
	Valoración		
	0.0%	3	
	0.5%	3	
	1.0%	3	
	5.0%	3	
	10.0%	3	
	20.0%	3	
	30.0%	3	
	40.0%	3	
50.0%	3		
2. PRECISION DEL SISTEMA	6 determinaciones consecutivas de la preparación del estándar al 100%		Coeficiente de variación en cuanto a: Factor de respuesta : $\leq 5.0\%$
3.PRECISION DEL METODO (CON PRODUCTO)	6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica		Coeficiente de variación de: - Principios activos (concentración de muestra): $\leq 5.0\%$


	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 5 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

PARÁMETROS	DETERMINACION	ESPECIFICACIONES
4.EXACTITUD (RECOBRO)	<p>Cantidades del estándar, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método), para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia.</p> <p>La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada.</p> <p>Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración)</p> <p>3 determinaciones de estándar al 100%</p>	<p>- Porcentaje de recobro: del 97.0% al 105.0%</p> <p>- Coeficiente de variación: $\leq 5.0\%$</p> <p>- Desviación estándar: $\leq 5.0\%$</p>
5. PRECISION INTERMEDIA	<p>Cada uno de 2 analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes</p> <p>Prueba de fisher</p> <p>Comparar La F calculada con la F tabulada,</p>	<p>Coeficiente de variación: - $\leq 5.0\%$</p>


	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 6 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

5.0 Resultados de validación del método analítico

PARÁMETROS	DETERMINACION		RESULTADOS	
1.LINEALIDAD	Concentraciones del estándar	Número de determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rango lineal 0.5%-50.0% ➤ Análisis de regresión que demuestre: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coeficiente de determinación (r^2) : 0.997 ▪ Desviada al origen: 0.09% <p>Dictamen: CUMPLE</p>	
	Valoración			
	0.0%			3
	0.5%			3
	1.0%			3
	5.0%			3
	10.0%			3
	20.0%			3
	30.0%			3
40.0%	3			
50.0%	3			
2. PRECISION DEL SISTEMA	6 determinaciones consecutivas de la preparación del estándar al 100%		<p>Coeficiente de variación: CV= 1.75</p> <p>Dictamen: CUMPLE</p>	
3.PRECISION DEL METODO (CON PRODUCTO)	<p>6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica</p>		<p>Coeficiente de variación de respuestas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Margarina Dany: 2.45 • Margarina Cremy: 2.76 • Margarina Suly: 1.75 <p>Dictamen: CUMPLE</p>	

	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 7 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

PARÁMETROS	DETERMINACION	RESULTADOS
4.EXACTITUD (RECOBRO)	<p>Cantidades del estándar, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método), para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia.</p> <p>La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada.</p> <p>Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración), 3 determinaciones de estándar al 100%</p>	<p>- Porcentaje de recobro: del 97.0% al 105.0%</p> <p>- Coeficiente de variación: 2.70</p> <p>- Desviación estándar: 2.74</p> <p>- Media de recuperación: 101.31%</p> <p>Dictamen: CUMPLE</p>
5. PRECISION INTERMEDIA	<p>Cada uno de 2 analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes</p> <p>Prueba de fisher</p> <p>Comparar La F calculada con la F tabulada,</p>	<p>Sumatoria de CV de analista 1 y 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Margarina Dany: 5.78 • Margarina Cremy: 5.42 • Margarina Suly: 4.27 <p>Prueba de Fisher: F de tabla= 3.18</p> <ul style="list-style-type: none"> • Margarina Dany: 0.1578 • Margarina Cremy: 1.7827 • Margarina Suly: 0.2955 <p>Dictamen: CUMPLE, se observa que la F calculada es menor que la F tabulada, por lo tanto no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días.</p>

	REPORTE DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 8 de 8
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001	Edición: 1	Fecha de Vigencia:	Febrero 2015

6.0 CONCLUSION Y DICTAMEN DE VALIDACIÓN

Cumplidas las especificaciones de las pruebas de: Linealidad, Precisión del Sistema, Precisión del método, Precisión intermedia, Exactitud queda establecido que el método analítico para la Cuantificación de grasas trans en margarina, funciona correctamente, por lo que, se concluye que este método, queda **VALIDADO** y está apto para ser utilizado.

DICTAMEN: CONFORME


Declarándole: **VALIDO** para su utilización.

7.0 BIBLIOGRAFÍA

- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH, Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005.
- Guía de Validación de Métodos Analíticos (editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C.)
- Norma Codex alimentarius stan 32-1981 (Rev 1-1989); Norma de CODEX para la Margarina.

5.10 ELABORACION DEL CERTIFICADO DE VALIDACIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados, se procedió a la elaboración del Certificado de Validación.

	CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 1 de 4
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001		Edición Protocolo: 1	

1. Resumen de protocolo de validación.

Objetivo:


La presente validación prospectiva, realizada determinando los parámetros: Linealidad, Precisión del Método, Precisión del Sistema Instrumental, Precisión Intermedia, Exactitud se llevó a cabo con la finalidad de obtener pruebas documentadas que demuestran que el método de análisis produce resultados confiables.

Responsables:

ANALISTA IRIS BLANCO


ANALISTA AYMEE CABALLERO

LIC. HENRY HERNANDEZ


	CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 2 de 4
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001		Edición Protocolo: 1	

1. Resumen de los resultados obtenidos

PARÁMETRO	DETERMINACION		RESULTADOS
1.LINEALIDAD	Concentraciones del estándar	Número de determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rango lineal 0.5%-50.0% ➤ Análisis de regresión que demuestre: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coeficiente de determinación (r^2) : 0.997 ▪ Desviada al origen: 0.09% Dictamen: CUMPLE
	Valoración		
	0.0%	3	
	0.5%	3	
	1.0%	3	
	5.0%	3	
	10.0%	3	
	20.0%	3	
	30.0%	3	
	40.0%	3	
50.0%	3		
2. PRECISION DEL SISTEMA	6 determinaciones consecutivas de la preparación del estándar al 100%		Coeficiente de variación: CV = 1.75 Dictamen: CUMPLE
3.PRECISION DEL METODO (CON PRODUCTO)	6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica		Coeficiente de variación de respuestas: <ul style="list-style-type: none"> • Margarina Dany: 2.45 • Margarina Cremy: 2.76 • Margarina Suly: 1.75 Dictamen: CUMPLE

	CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 3 de 4
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001		Edición Protocolo: 1	

PARÁMETRO	DETERMINACION	RESULTADOS
4.EXACTITUD (RECOBRO)	<p>Cantidades del analito, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método), para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia.</p> <p>La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada.</p> <p>Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración)</p> <p>3 determinaciones de estándar al 100%</p>	<p>- Porcentaje de recobro: del 97.0% al 105.0%</p> <p>- coeficiente de variación:2.70</p> <p>- Desviacion estándar: 2.74</p> <p>- Media de recuperación: 101.31%</p> <p>Dictamen: CUMPLE</p>
5. PRECISION INTERMEDIA	<p>Cada uno de 2 analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes</p> <p>Prueba de fisher</p> <p>Comparar La F calculada con la F tabulada</p>	<p>Sumatoria de CV de analista 1 y 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Margarina Dany: 5.78 • Margarina Cremy: 5.42 • Margarina Suly: 4.27 <p>Prueba de Fisher: F de tabla= 3.18</p> <ul style="list-style-type: none"> • Margarina Dany: 0.1578 • Margarina Cremy: 1.7827 • Margarina Suly: 0.2955 <p>Dictamen: CUMPLE, se observa que la F calculada es menor que la F tabulada, por lo tanto no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días.</p>

	CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO		CONFIDENCIAL
Código 01	Edición: 1	Vigente a partir de : Febrero 2015	Página 4 de 4
Nombre del Producto o Materia Prima:		Grasas Trans en Margarina	
Código Protocolo: GT001		Edición Protocolo: 1	

2. Conclusiones.

Tras el estudio de todo el proceso de análisis, conjunto de datos, observaciones y documentos detallados en el Protocolo y reporte de Validación se emite el presente DICTAMEN DE VALIDACION.

Método de Análisis:

DICTAMEN: CUMPLE

Declarándole: VALIDO para su utilización

Elaborado por:

Revisado por:

Autorizado por:

Firma:			
Nombre:	Aymee Caballero	Iris Blanco	Lic Henry Hernández
Cargo:	Analista	Analista	Asesor
Fecha:	Febrero 2015	Febrero 2015	Febrero 2015

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las muestras de las marcas de margarina Cremy, Suly y Dany presentaron el pico de absorción característico de ácidos grasos trans en la región de 966 cm^{-1} , lo que confirma la presencia de ácidos grasos trans.
2. En la evaluación de la linealidad se obtuvo un coeficiente de determinación mayor al 0.98 y una pendiente dentro del valor esperado por lo que se concluye que el método es lineal.
3. El método demostró ser preciso ya que se obtuvieron resultados del porcentaje de coeficiente de variación (CV) menores a 5.0%
4. Podemos decir que el método es exacto para la cuantificación de grasas trans, ya que el porcentaje de recuperación de los estándares de trioleina y trielaidina estuvieron dentro del 97.0-105.0 %.
5. Podemos ver que la metodología de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC) 2000:10 se adecuó a las condiciones del Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador para el análisis de ácidos grasos trans en Margarina debido a que los resultados obtenidos fueron confiables, exactos y precisos en cada uno de los parámetros evaluados.

CAPITULO VII
RECOMEDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. A las autoridades del Ministerio de Salud que realicen las gestiones pertinentes para que en El Salvador exista una normativa que regule la cantidad de ácidos grasos trans presentes en las margarinas que son comercializadas en El Salvador.
2. A las entidades encargadas de la vigilancia y registro de productos alimenticios, monitorear la presencia de grasas trans en margarina que en el etiquetado nutricional reportan “cero grasas trans”.
3. A la Facultad de Química y Farmacia y entidades responsables que implementen la metodología para la determinación de ácidos grasos trans en otras matrices alimenticias y den seguimiento al análisis para su posterior validación.
4. Que en próximos estudios de validación del método de cuantificación de ácidos grasos trans en margarina tener siempre en cuenta que se deben utilizar los estándares indicados por la metodología desarrollada y así poder garantizar que los resultados son confiables.
5. A las autoridades de la Facultad de Química y Farmacia que apoyen al Laboratorio de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia para que se gestione la constante calibración y mantenimiento del equipo de Espectrofotometría Infrarrojo Shimadzu IR Affinity para la obtención de resultados confiables y precisos.

6. A las autoridades de la Facultad de Química y Farmacia que apoyen al Laboratorio de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia para que gestione la compra de estándares de Trioleina y Trielaidina para próximos análisis de ácidos grasos trans en margarina.

BIBLIOGRAFIA

1. Bernardini, E. 1997. Planta de la producción de margarina. (Monografía). México. Disponible en:
<http://www.monografias.com/trabajos17/margarina/margarina.shtml>
2. Bruno Rodríguez, E.B. López Miranda, C.E. Adecuación del Método de Espectroscopia Infrarroja en la Identificación de Grasas Trans en Margarina.[Tesis]. San Salvador, 2012.
3. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. México A.C. Anexos 59, 60, 61, 62, 66, 67,68.
4. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). NSR ISO/IEC 17025:2010. Norma Salvadoreña.
5. Cormillot, A. Margarina, [Nutropedia], Disponible en:
<http://www.drcormillot.com/nutropedia/210/margarina.html>
6. FDA. Hablemos de las grasas trans. FOODS FACTS [Revista en internet] 2006 [Mayo 2013];
[<http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/UCM210720.pdf>]
7. Fundación Eroski. 2003. Las garantías de seguridad de la margarina (Artículo). España. Disponible en:
http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/09/09/8204.php

8. García Menéndez, D.V; Melgar Santiago, G.E; Validación del Método Espectrofotométrico (3500-Fe D) de la Fenantrolina para Determinación de Hierro Total en Agua Potable. [Tesis], San Salvador, 2011.
9. Hernández Martínez; D.M, Desarrollo de Métodos Quimiométricos mediante Espectroscopia FTIR-HATR para cuantificar parámetros químicos y perfil de ácidos grasos cis y trans en margarina[Tesis], Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Mexico, 2010.
10. La Margarina. Microsoft® Encarta® 2006. Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos, 1993-2005
11. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB, Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials, Department of Human Biology, Maastricht University, Maastricht, Netherlands. 2003 May [PubMed]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716665>
12. Norma Alimentos – Margarina para mesa – Especificaciones (NMX-F-016-SCFI-2007), Secretaría de Economía, México, 2007.
13. Norma Codex alimentarius stan 32-1981 (Rev 1-1989); Norma de CODEX para la Margarina.
14. Toledo A. 1990. Determinación de colesterol en margarinas y mantecas Vegetales. 2da Edición. Editorial Limusa. Pág. 365-389
15. Wrolstand R, Acree T, Drecker E. Handbook of Food Analytical Chemistry, 2005, Jhon Wiley & Sons, New Jersey.

ANEXOS

ANEXO N° 1

**Cuadro de parámetros para métodos Normalizados según guía de
validación de CONACYT, El Salvador**

Parámetros	Métodos Normalizados			
	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios**	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas**	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Sí	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del Sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del Método	No	+	+	+
Rango	No	+	+	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión Intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	+	No	No	No
Límite de Cuantificación	No	+	+	+
Robustez	+	+	+	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis

++: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

*: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (ej: disolución, liberación de analitos, etc) el método usado para la cuantificación (cuando aplique) se validará de acuerdo a columnas 2 ó 3.

Figura N° 7. Cuadro de parámetros guía del CONACYT

ANEXO N°2

Método oficial de análisis infrarrojo de grasas según AOAC

AOAC Official Method 2000.10

Determination of Total Isolated *Trans* Unsaturated Fatty Acids in Fats and Oils by ATR-FTIR.

(This method is applicable to natural or processed oils and fats consisting of long-chain fatty acids, esters and triglycerides with *trans* levels $\leq 5.0\%$.)

Table 2000.10 Interlaboratory Study results for Total Isolated *trans* Content by ATR-FTIR

ID	True Value	\bar{x} , %	# Labs ^{a(b)}	S _r	% RSD _r	S _R	% RSD _R	% Rec
		0.8	11(1)	0.1	7.5	0.2	21.1	103
		1.0	12(0)	0.1	10.5	0.3	29.3	97
		5.1	12(0)	0.1	2.3	0.2	3.1	102
		10.3	12(0)	0.4	3.6	0.5	5.1	103
		15.6	12(0)	0.3	2.2	0.5	3.3	103
		20.6	11(1)	0.9	4.5	1.0	5.0	103
		40.1	12(0)	1.4	3.5	1.4	3.5	100

a(b) a= number of labs retained after eliminating outliers, (b)= number of labs removed as outliers

A. Principle

In most naturally occurring vegetable fats and oils, unsaturated constituents contain only isolated double bonds in the *cis* configuration. These *cis* double bonds may be isomerized to the *trans* configuration during extraction and processing procedures, due to oxidation, conversion during heating, and/or partial hydrogenation. Animal and marine fats may contain measurable amounts of naturally occurring *trans* fatty acid geometric isomers. Isolated *trans* double bonds in long-chain fatty acids, fatty acid methyl esters (FAME), soaps and triacylglycerols may be measured by infrared (IR) spectroscopy. A unique absorption band with a maximum at ca 966 cm⁻¹ (10.3 μm), arising from a C-H deformation vibration about a *trans* double bond, is exhibited in the spectra of all compounds containing an isolated *trans* group; this band is not observed in the spectra of the corresponding saturated and *cis* unsaturated fatty acids. Measurement of the intensity of this absorption band under analytically controlled conditions is the basis for a quantitative method for the determination of total isolated *trans* fatty acids. Fat and oil test samples are not required to be converted to FAME prior to analysis.

This method is not applicable to fats and oils containing ca > 1% of conjugated unsaturation (e.g., tung oil), materials containing functional groups which modify the intensity of the C-H deformation vibration about the *trans* double bond (e.g., castor oil which contains hydroxy fatty acids), or, in general, to any materials containing constituents which have functional groups that give rise to specific absorption bands at, or sufficiently close to interfere with, the 966 cm⁻¹ (10.3 μm) band of the C-H deformation vibration of the isolated *trans* double bond.

B. Apparatus

- (a) *Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer.*-- Capable of making measurements at 4 cm^{-1} resolution in the spectral range covering $1050\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. The instrument data handling system to allow conversion of the spectra to absorbance, scale expansion of the x and y axes, readout of wavenumbers to the nearest 1 cm^{-1} and absorbance to the nearest 0.0001 amu, and integration of the area under the absorption band at 966 cm^{-1} . FTIR spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector for greatest linearity. In the absence of test samples, a 1-min data collection at 4 cm^{-1} resolution must yield, between $1050\text{ - }900\text{ cm}^{-1}$, a peak-to-peak noise level of ≤ 0.0005 amu. The 966 cm^{-1} band for a 1% trielaidin standard, must yield a signal to noise ratio $> 10:1$.
- (b) *Attenuated total reflection (ATR) infrared cell.*-- Equipped with a zinc selenide (or equivalent) crystal. The capacity of the horizontal ATR cell is ca $50\text{ }\mu\text{L}$ and is capable of maintaining a constant temperature of $65 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.
- (c) *Analytical balance.*-- With 60 g capacity; capable of weighing $0.3\text{ g} \pm 0.0001\text{ g}$.
- (d) *Disposable plastic pipets.*-- Capable of transferring $50\text{ }\mu\text{L}$ test samples to ATR cell.
- (e) *Steam water bath.*-- For melting fats.

C. Reagents

- (a) *Primary standards.*-- Trielaidin (TE) and triolein (TO) with purity $>99\%$ (available from Nu Check Prep, Inc., P.O. Box 295, Elysian, MN 56028 USA).

D. Preparation of Standards

Trans Calibration Standards. Weigh, to the nearest 0.0001 g , $(0.3-x)\text{ g}$ of TO, and $x\text{ g}$ of TE, into a 10 mL beaker, where x equals 0.0015 , 0.0030 , 0.0150 , 0.0300 , 0.0600 , 0.0900 , 0.1200 and 0.1500 g , in order to prepare 0.5 , 1 , 5 , 10 , 20 , 30 , 40 , and 50% *trans* calibration standards, respectively.

E. Calibration

For each *trans* standard, calculate the exact % *trans* expressed as the amount of TE as percent of total fat. Analyze each standard and determine the integrated area under the absorption band at 966 cm^{-1} as described in G and H.

Using a first-order regression analysis, determine the slope and intercept of the line which best fits the plot of the area of the *trans* band for all the *trans* standards (y axis) as a function of % *trans* (x axis). Once a calibration curve has been established, it must be checked periodically to insure that it has not shifted.

F. Preparation of Test Samples

Solid fats must be gently melted and mixed. Test samples that appear cloudy due to the presence of water should be treated with anhydrous sodium sulfate until clear and filtered before removing the test portion for analysis.

G. Infrared Determination

Set up the FTIR operating parameters according to the manufacturer's recommendations for using an ATR cell with the following parameters: 1050-900 cm^{-1} range, 64-scan (or appropriate number of scans needed to meet peak-to-peak noise level and SNR requirements given in B), 4 cm^{-1} resolution, and triangular apodization functions (the most common weighting functions in FTIRs that suppress the magnitude of side lobes of interferograms). Conditions employed must be identical for test samples and calibration standards. The performance of FTIRs must be evaluated for wavenumber accuracy and noise level to insure that they are operating within the manufacturer's established specifications. For solid fats maintain ATR cell at 65 ± 2 °C.

Materials for measuring the reference background single beam spectrum are (a) TO for calibration standards, (b) the unfortified material for *trans*-fortified test samples, and (c) an appropriate *trans*-free material such as the refined bleached source oil for test samples.

Using a disposable pipet, transfer (without weighing) ca 50 μL of the neat (undiluted in any solvent) reference background material. Place the reference background material on the horizontal (face-up) ZnSe sampling surface of the ATR cell. The test portion must *completely* cover the horizontal surface of the crystal. Collect and save the single-beam spectrum to be used as background. Clean the crystal by wiping off the test portion with a disposable soft lint-free or low-lint tissue paper. In general, to minimize contamination, apply part of the next test portion then wipe it off the crystal before re-applying the ca 50 μL test portion for analysis.

Place ca 50 μL (without weighing) of the neat test portion on the horizontal ZnSe crystal. It must *completely* cover the surface of the crystal. Collect and save the single-beam spectrum of the test portion.

Ratio the test sample single-beam spectrum against that of the reference background, and convert to absorbance. Save the absorption spectrum. Repeat for other test samples.

H. Calculations

With the absorbance spectrum wavenumber scale expanded in the region from 1050 - 900 cm^{-1} , integrate (electronically) the area under the 966 cm^{-1} band between the limits 990 - 945 cm^{-1} . Calculate the linear regression equation for Area vs. % *trans* plot of the *trans* calibration standards.

Using the slope and intercept generated for *trans* standards, calculate the % *trans* for test samples, by substituting the value of the integrated area of the *trans* band in the following equation:

$$\text{trans fat as TE, \%} = \frac{[\text{Area} - \text{Intercept}]}{\text{Slope}}$$

Report results to the nearest 0.1%.

Traducción a idioma español

Determinación del total de ácidos grasos insaturados aislados en grasas y aceites por medio de ATR-FTIR.

(Este método es aplicable a aceites y grasas naturales o procesadas que contienen una cadena larga de ácidos grasos, esterés y triglicéridos con $\pm .0\%$ niveles *trans*).

PRINCIPIO

En la mayoría de grasas y aceites vegetales de origen natural, los componentes insaturados contienen solamente dobles enlaces aislados de configuración *cis*. Estos enlaces dobles *cis* se pueden isomerizar a configuración *trans* durante su procesamiento y extracción, por oxidación, mientras su calentamiento y proceso de hidrogenación parcial. Las grasas animales y marinas pueden contener cantidades medibles de isómeros geométricos de ácidos grasos *trans* de origen

natural. Los enlaces dobles trans aislados en los ácidos grasos de cadena larga, los esteres metílicos de ácidos grasos, los jabones y triacilglicerolos se pueden medir por espectroscopia infrarroja (IR). Una banda de absorción única con un máximo en la región de 966 cm^{-1} ($\mu\text{m } 10.3$), que se presenta por una vibración de la deformación de un enlace doble C-H trans, se exhibe en los espectro de todos los compuestos que contienen un grupo trans aislado. Esta banda no se observa en los espectros de los correspondientes a los ácidos grasos saturados e insaturado cis. La medida de la intensidad de esta banda de absorción bajo condiciones analíticamente controladas es la base para un método cuantitativo para la determinación de ácidos grasos trans totales. No se requiere que las muestras de ensayo, grasas y aceites se conviertan a esteres metílicos de ácidos grasos antes del análisis.

Este método es aplicable para grasas y aceites que contengan $> 1\%$ de la instauración conjugada, materiales que contenga grupos funcionales que modifiquen la intensidad de la vibración de la deformación C-H de la doble banda trans, o en general a cualquier material que contenga constituyentes cuyos grupos funcionales que generan una banda de absorción específica, o que este suficientemente cerca de interferir con la banda de vibración de absorción C-H de la doble banda trans asilada 966 cm^{-1} .

APARATO

a. Espectrómetro infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR): Capaz de hacer mediciones a una resolución de 4 cm^{-1} en la región del espectro cubriendo $1050 - 900\text{ cm}^{-1}$. El sistema de manipulación de datos tiene un instrumento que permite la conversión del espectro a absorbancia, la expansión de escala del eje de las x, y, la lectura del número de onda cercano a 1 cm^{-1} y absorbancia cerca de 0.0001mu e integración del área bajo la banda de absorción a 966 cm^{-1} . El espectrómetro FTIR equipado con un detector de sulfato de triglicinadeuterado

(DTGS) de una excelente linealidad. En la ausencia de muestras de ensayo, una recolección de datos de 1 min a una resolución de 4 cm^{-1} debe ceder, entre $1050 - 900 \text{ cm}^{-1}$, un nivel de ruido pico a pico de número 0.0005 amu. La banda de 966 cm^{-1} para el estándar de Trielaidina 1%, debe ceder una señal de ruido $> 10:1$.

b. Celda infrarroja de Reflectancia Total Atenuada (ATR): Equipada con un cristal de Selenio de Zinc. La capacidad de la celda ATR horizontal es $50 \mu\text{L}$ y es capaz de mantener una temperatura constante de $65 \pm ^\circ\text{C}$.

c. Balanza Analítica: Con capacidad de 60 g, capaz de medir $0.3 \text{ g} \pm 0.0001\text{g}$.

d. Pipetas de plástico descartables: Capaces de transferir $50 \mu\text{l}$ de la muestra del ensayo a la celda ATR.

e. Baño de vapor: Para derretir las grasas.

REACTIVOS

Estándares primarios: Trielaidina (TE) y Trioleina (TO) de pureza $> 99.0\%$

PREPARACION DE ESTANDARES

Pesar cerca del 0.0001 g ($0.3-x$)g de Trioleina, y $x \text{ g}$ de Trielaidina, en un beaker de 10 mL , en donde x es igual a 0.0015 , 0.0030 , 0.0150 , 0.0300 , 0.600 , 0.0900 , 0.1200 y 0.1500g , para preparar 0.5 , 1 , 5 , 10 , 20 , 30 , 40 y 50% estándares de calibración trans respectivamente.

CALIBRACION

Para cada estándar trans, calcular el porcentaje exacto trans expresado como la cantidad de TE como porcentaje de grasas totales. Analizar cada estándar y determinar el área integrada bajo la banda de absorción a 966 cm^{-1} .

Usando un análisis de regresión de primer orden, determinar la pendiente y el intercepto de la línea que mejor encaje en el área de las bandas trans de todos los estándares trans (eje de las y) en función de porcentaje trans (eje de las x).

Una vez se haya establecido la curva de calibración debe ser revisada periódicamente para asegurar que no esté desplazada.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Las grasas solidas deben derretirse y mezclarse correctamente. Si existe alguna muestra que aparezca nublada debido a la presencia de agua se deben tratar con sulfato de sodio anhidro, hasta que las veamos claras, filtrar el contenido antes de remover la porción que se ocupara para el análisis.

DETERMINACION INFRARROJA

Establecer los parámetros de operaciones de FTIR, de acuerdo a lo que recomienda el fabricante, para hacer uso de una celda ATR, con los siguientes parámetros: rango de $1050 - 900 \text{ cm}^{-1}$, 64 determinaciones (a un número apropiado de determinaciones que sean necesarias para satisfacer los niveles de ruido pico a pico), resolución de 4 cm^{-1} y funciones de apodización triangulares (las funciones de ponderación más comunes en FTIR que inhiben la magnitud de los lóbulos laterales de interferogramas). Deben utilizarse las mismas condiciones para las muestras del ensayo y para la calibración de los estándares. El rendimiento de FTIR debe ser evaluado para una longitud de onda exacta y nivel de ruido para asegurar que están operando dentro de las especificaciones que establece el fabricante. Para grasas solidas debe mantenerse la celda ATR a temperatura de $62 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los materiales para medir el fondo del espectro del haz de referencia son:

- a. Trioleina para calibración,
- b. Material sin fortificar para muestras de ensayo trans-fortificadas,
- c. Un material apropiado libre de grasas trans, tales como el aceite refinado que es una fuente blanqueada.

Usando una pipeta desechable, transferir 50µL de material base de referencia ordenado. Poner el material de base de referencia en la celda ATR de ZnSe horizontal. La porción del ensayo debe cubrir completamente la superficie horizontal del cristal.

Recolectar y guardar todos los espectros de un solo haz para ser usados como base. Limpiar el cristal sacando la porción del ensayo con un papel suave de seda desechable. En general para minimizar la contaminación, aplicar parte de la próxima muestra y volver a limpiar el cristal antes de volver a agregar 50µL de la porción de la muestra para el análisis.

Colocar alrededor de 50µL de la porción de ensayo ordenada en el cristal horizontal de ZnSe. Debe cubrir completamente la superficie del cristal.

Recolectar y guardar todos los espectros de un solo haz. Relacionar el espectro de un solo haz de la muestra de ensayo contra el espectro base de referencia y convertir a absorbancia. Guardar el espectro de absorción. Repetir con las otras muestras.

CALCULOS

Con la escala de longitud de onda del espectro de absorbancia, que se expande desde 1050 – 900 cm^{-1} , integrar el área bajo la banda 966 cm^{-1} entre los límites de 900 – 945 cm^{-1} . Calcular la ecuación de la regresión lineal para área vs % de área de la calibración de los estándares trans. Usando la pendiente y el intercepto generado por los estándares trans, calcular el porcentaje de % trans de las muestras de ensayo, sustituyendo el valor del área integrada de las bandas trans en la siguiente ecuación:

$$\text{Grasas trans como TE, \%} = \frac{[\text{Area} - \text{Intercepto}]}{\text{Pendiente}}$$

Reportar los resultados lo más cercano a 0.1%.

ANEXO N° 3
CERTIFICADO DE ANALISIS DE ESTÁNDAR DE TRIOLEINA

NU-CHEK PREP, INC.

P.O. Box 295 Elysian MN 56028 U.S.A.

The home of fine Lipid Organics

LOWELL J. NUTTER
BRIAN L. NUTTER

PHONE (507) 267-4582
(507) 267-4689
FAX (507) 267-4790
info@nuchekprep.com
www.nu-chekprep.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

DATE: April 23, 2014

SCIENTIFIC NAME: 1,2,3 TRI CIS-9 OCTDECENOYL GLYCEROL

COMMON NAME: TRIOLEIN

DENSITY: 0.90 GM/ML

GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY: >99% ON METHYL ESTER

THIN LAYER CHROMATOGRAPHY: SHOWS ONLY THE TRIGLYCERIDE MOIETY PRESENT

FORMULA: C₅₇H₁₀₄O₆

APPEARANCE: CLEAR COLORLESS LIQUID AT ROOM TEMPERATURE

LOT: T-235-S13-X

ORIGINAL SOURCE OF MATERIAL: SUNFLOWER OIL

FORMULA WEIGHT: 885.50

CAS # 122-32-7

THE EXPIRATION DATE ON STANDARDS RECEIVED FROM NU-CHEK-PREP IS 3-6 MONTHS ON AN OPENED VIAL UNDER GOOD STORAGE CONDITIONS. UNLIMITED IF THE VIAL IS UNOPENED. GOOD STORAGE CONDITIONS FOR AN OPENED VIAL IS KEPT AT 0 DEGREES CENTIGRADE OR COLDER AND FLUSHED WITH AN INERT GAS LIKE NITROGEN OR ARGON. THIS RIDES IT OF OXYGEN WHICH CAN CAUSE OXIDATION. FOR AN UNOPENED VIAL IT SHOULD BE KEPT AT 0 DEGREES OR COLDER.

THE EXPIRATION DATE STARTS THE DAY THE BUYER RECEIVES IT.

OUR UNSATURATED COMPOUNDS ARE INSERTED IN VIALS BY VOLUME AND NOT WEIGHT, FLUSHED WITH NITROGEN AND SEALED UNDER HIGH VACUUM. EACH VIAL CONTAINS AT LEAST THE MINIMUM AMOUNT SPECIFIED ON THE LABEL.

SAFETY DATA INFORMATION

THIS COMPOUND MAY BE HARMFUL IF SWALLOWED, INHALED OR ABSORBED THROUGH THE SKIN. IT MAY CAUSE EYE IRRITATION, BE IRRITABLE TO MUCOUS MEMBRANES AND UPPER RESPIRATORY TRACT.

TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES HAVE NOT BEEN FULLY INVESTIGATED.

CONTAMINATION OF THE EYES OR SKIN SHOULD BE FOLLOWED BY WASHING WITH LARGE AMOUNTS OF WATER.

ALL OF THE COMPOUNDS WHICH YOU HAVE PURCHASED FROM NU-CHEK-PREP ARE HIGHLY PURIFIED LIPID STANDARDS THAT HAVE BEEN ISOLATED OR SYNTHESIZED FROM VARIOUS VEGETABLE OILS.

AS A FINAL PRECAUTIONARY MEASURE, ALL RESIDUAL VOLATILE ORGANIC CONTAMINATES ARE REMOVED BY HIGH VACUUM FRACTIONAL DISTILLATION. SINCE MANY OF OUR PURE PRODUCTS ARE UNSATURATED, THE FINAL PRODUCT IS GENERALLY FLUSHED WITH INERT GAS (i.e., N₂) AND HERMETICALLY SEALED IN GLASS VIALS UNDER VACUUM AND STORED UNDER LOW TEMPERATURE (0°C) CONDITIONS UNTIL READY FOR SHIPMENT.

THESE PRODUCTS ARE PREPARED IN SMALL RESEARCH QUANTITIES FOR THE LIPID ORGANIC SCIENTIFIC COMMUNITY. WHILE THESE MATERIALS MAY BE TOXIC, THEY ARE NOT INTENDED FOR HUMAN CONSUMPTION OR AS A MEDICINAL OR DRUG RELATED USES. OUR PRODUCTS ARE USED IN ANIMAL STUDIES AND AS STANDARDS STRICTLY FOR RESEARCH.

WE CERTIFY THAT THIS LOT CONFORMS TO THE PRODUCT SPECIFICATIONS AND HAS BEEN RELEASED FOR SALE.

ANEXO N° 4
CERTIFICADO DE ANALISIS DE ESTÁNDAR DE TRIELAIDINIA

NU-CHEK-PREP, INC.

P.O. Box 295 Elysian MN 56028 U.S.A.

The home of fine Lipid Organics

LOWELL J. NUTTER
BRIAN L. NUTTER

PHONE (507) 267-4582
(507) 267-4689
FAX (507) 267-4790
info@nuchekprep.com
www.nu-chekprep.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

DATE: APRIL 23, 2014

SCIENTIFIC NAME: 1,2,3 TRI[TRANS-9-OCTADECENOYL]-GLYCEROL

COMMON NAME: TRIELAIDIN

DENSITY: UNKNOWN

GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY: >99% ON METHYL ESTER

THIN LAYER CHROMATOGRAPHY: SHOWS ONLY THE TRIGLYCERIDE MOIETY PRESENT

FORMULA: C₅₇H₁₀₄O₆

APPEARANCE: SOLID AT ROOM TEMPERATURE

LOT: T-240-04-X

ORIGINAL SOURCE OF MATERIAL: SUNFLOWER OIL

FORMULA WEIGHT: 885.50

CAS # 537-39-3

SHELF LIFE: UNLIMITED IF UNOPENED AND STORED AT 0 DEGREES CENTIGRADE OR COLDER. ONCE OPENED, 6-12 MONTHS UNDER GOOD STORAGE CONDITIONS

OUR UNSATURATED COMPOUNDS ARE INSERTED IN VIALS BY VOLUME AND NOT WEIGHT, FLUSHED WITH NITROGEN AND SEALED UNDER HIGH VACUUM. EACH VIAL CONTAINS AT LEAST THE MINIMUM AMOUNT SPECIFIED ON THE LABEL.

SAFETY DATA INFORMATION

THIS COMPOUND MAY BE HARMFUL IF SWALLOWED, INHALED OR ABSORBED THROUGH THE SKIN. IT MAY CAUSE EYE IRRITATION, BE IRRITABLE TO MUCOUS MEMBRANES AND UPPER RESPIRATORY TRACT.

TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES HAVE NOT BEEN FULLY INVESTIGATED.

CONTAMINATION OF THE EYES OR SKIN SHOULD BE FOLLOWED BY WASHING WITH LARGE AMOUNTS OF WATER.

ALL OF THE COMPOUNDS WHICH YOU HAVE PURCHASED FROM NU-CHEK-PREP ARE HIGHLY PURIFIED LIPID STANDARDS THAT HAVE BEEN ISOLATED OR SYNTHESIZED FROM VARIOUS VEGETABLE OILS.

AS A FINAL PRECAUTIONARY MEASURE, ALL RESIDUAL VOLATILE ORGANIC CONTAMINATES ARE REMOVED BY HIGH VACUUM FRACTIONAL DISTILLATION. SINCE MANY OF OUR PURE PRODUCTS ARE UNSATURATED, THE FINAL PRODUCT IS GENERALLY FLUSHED WITH INERT GAS (i.e., N₂) AND HERMETICALLY SEALED IN GLASS VIALS UNDER VACUUM AND STORED UNDER LOW TEMPERATURE (-30°C) CONDITIONS UNTIL READY FOR SHIPMENT.

THESE PRODUCTS ARE PREPARED IN SMALL RESEARCH QUANTITIES FOR THE LIPID ORGANIC SCIENTIFIC COMMUNITY. WHILE THESE MATERIALS MAY BE TOXIC, THEY ARE NOT INTENDED FOR HUMAN CONSUMPTION OR AS A MEDICINAL OR DRUG RELATED USES. OUR PRODUCTS ARE USED IN ANIMAL STUDIES AND AS STANDARDS STRICTLY FOR RESEARCH.

WE CERTIFY THAT THIS LOT CONFORMS TO THE PRODUCT SPECIFICATIONS AND HAS BEEN RELEASED FOR SALE.

ANEXO N° 5
PROCEDIMIENTO EN EL EQUIPO DE ESPECTROFOTOMETRIA
INFRARROJO IR- SHIMADZU AFFINITY

PROCEDIMIENTO

Parte I: Análisis de Muestras de Margarina

- a. Encender el espectrofotómetro IR y la computadora
- b. Inicializar el programa IR-Solution
- c. Conectar el computador por medio del programa con el espectrofotómetro IR utilizando el comando "**Measure**", comando "**Admin**", Inicializar. Dejar un tiempo de equilibrio de 15 minutos.
- d. Permitir que el programa registre las condiciones del equipo y que reconozca automáticamente el accesorio ATR.
- e. Dejar correr un barrido de las condiciones iniciales del equipo con la unidad ATR armada sin muestra como sigue: utilizar el comando "**Measure**", y presionar "**BKG**" para obtener el espectro blanco (Background).
- f. Tomar una cantidad de la muestra desde su empaque primario con una espátula y colocar en un tubo de boca ancha de 50 mL.
- g. Tratar la muestra de la siguiente manera: Colocar el tubo de ensayo donde se encuentra la muestra en un baño de maría Precitherm y controlar con un termómetro que la temperatura se encuentre a $62^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta la fundición y separación de las fases.
- h. Tomar una pequeña cantidad de muestra fundida con una pipeta o un gotero.
- i. Colocar la muestra distribuida uniformemente en el cristal de la celda y acoplarla en la unidad ATR del equipo Infrarrojo Shimadzu IR-Affinity.
- j. Analizar la muestra presionando el comando el comando "**Measure**", coleccionar la información de la muestra en el espacio "**coment**" y presionar en "**Sample**" para obtener el espectro correspondiente para identificar la muestra de los 4000 a los 500 cm^{-1} .
- k. Limpiar la celda con un pañuelo suave y luego con un algodón impregnado de alcohol.
- l. Comparar los espectros obtenidos con el patrón positivo y negativo recabado.

- m. Observar si existe la presencia de la deformación del enlace C=C del isómero Trans que aparece cercano a los 966 cm^{-1} .

Parte 2: Obtención de espectros de estándares. Proceder de forma similar que

III. PROCEDIMIENTO, parte 1, literales a,b y c

- a. Limpiar el material de ventana de la celda de Bromuro de potasio con algodón impregnado con acetona grado ACS.
- b. Armar la celda sin estándar
- c. Colocar la celda en el compartimiento para celdas espectrofotómetro IR y obtener el espectro de blanco (Background).
- d. Sacar la celda, desarmarla y volver a limpiar la celda de la misma forma que en el literal B. de la Parte 2
- e. Quebrar con cuidado, las ampollas que contienen los estándares y extraer con una jeringa de tuberculina un equivalente a media gota.
- f. Colocar la cantidad medida del Estándar en una cara de la ventana limpia y seca para luego colocar la otra ventana sobre la anterior, permitiendo que el estándar se distribuya uniformemente y sin burbujas.
- g. Armar con cuidado la celda
- h. Colocar la celda en el Espectrofotómetro IR y obtener el espectro Infrarrojo del estándar desde los 4000 a los 400 cm^{-1} .
- i. Sacar la celda y Volver a limpiar la celda de la misma manera que en el literal B. de la Parte 2 y proceder con el siguiente estándar según los pasos F. a I.
- j. Al finalizar dejar las ventanas de celda limpia y seca en desecador.

ANEXO N° 6
CALCULOS DE LINEALIDAD

CALCULOS DE LINEALIDAD

✓ **Pendiente**

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad b_1 = \frac{11(94.10) - (211.5)(3.013)}{11(8051.25) - (211.5)^2} \quad b_1 = \frac{1035.1 - 637.2495}{88563.75 - 44732.25}$$

$$b_1 = 0.009$$

✓ **Ordenada al origen**

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n} \quad b_0 = \frac{(3.013) - (0.009)(211.5)}{11} \quad b_0 = \frac{1.1095}{11}$$

$$b_0 = 0.1$$

✓ **Coefficiente de determinación**

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

$$r^2 = \frac{(11)(94.10) - (211.5)(3.013))^2}{(11(8051.25) - (211.5)^2)(11(1.155) - (3.013)^2)}$$

$$r^2 = \frac{(1035.1 - 637.2495)^2}{(88563.75 - 44732.25)(12.705 - 9.078169)}$$

$$r^2 = \frac{158285.0204}{(43831.5)(3.626831)} \quad r^2 = \frac{158285.0204}{158969.443}$$

$$r^2 = 0.996$$

✓ **Intervalo de confianza para la pendiente**

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}} \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{1.155 - ((0.009)(94.10)) - ((0.1)(3.013))}{11-2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{1.155 - 0.8542 - 0.2994}{9}} \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{0.0014}{9}} \quad S_{y/x} = \sqrt{0.00015556} \quad S_{y/x} = 0.01054$$

$$Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$Sb_1 = 0.01054 \sqrt{\frac{1}{8051.25 - \frac{(211.5)^2}{11}}} \quad Sb_1 = 0.01054 \sqrt{\frac{1}{8051.25 - \frac{44732.25}{11}}}$$

$$Sb_1 = 0.01054 \sqrt{\frac{1}{8051.25 - 4066.56818}} \quad Sb_1 = 0.01054 \sqrt{\frac{1}{3984.68182}}$$

$$Sb_1 = 0.01054 \sqrt{0.00025096} \quad Sb_1 = 0.01054(0.01584175)$$

$$Sb_1 = 0.00017$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} Sb_1$$

$$IC(\beta_1) = 0.009 \pm ((2.26)(0.00017)) \quad IC(\beta_1) = 0.009 \pm ((2.26)(0.00017))$$

$$IC(\beta_1) = 0.009 \pm 0.0003842$$

$$IC(\beta_1) = 0.009 + 0.0003842 = 0.0094$$

$$IC(\beta_1) = 0.009 - 0.0003842 = 0.00862$$

✓ Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad \bar{x} = \frac{211.5}{11} \quad \bar{x} = 23.5$$

$$Sb_o = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\tilde{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$Sb_o = 0.01054 \sqrt{\frac{1}{11} + \frac{(23.5)^2}{8051.25 - \frac{(211.5)^2}{11}}} \quad Sb_o = 0.01054 \sqrt{\frac{1}{11} + \frac{552.25}{8051.25 - \frac{44732.25}{11}}}$$

$$Sb_o = 0.01054 \sqrt{0.09090909} + \frac{552.25}{8051.25 - 4066.56818}$$

$$Sb_o = 0.01054 \sqrt{0.09090909} + \frac{552.25}{3984.68182}$$

$$Sb_o = 0.01054 \sqrt{0.09090909} + 0.13859325 \quad Sb_o = 0.01054 \sqrt{0.22950234}$$

$$Sb_o = 0.01054(0.47906403)$$

$$Sb_o = 0.00504933$$

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$IC(\beta_0) = 0.1 \pm ((2.26)(0.005)) \quad IC(\beta_0) = 0.1 \pm (0.0114115)$$

$$IC(\beta_0) = 0.1 + 0.0114 = 0.1114$$

$$IC(\beta_0) = 0.1 - 0.0114 = 0.0885$$

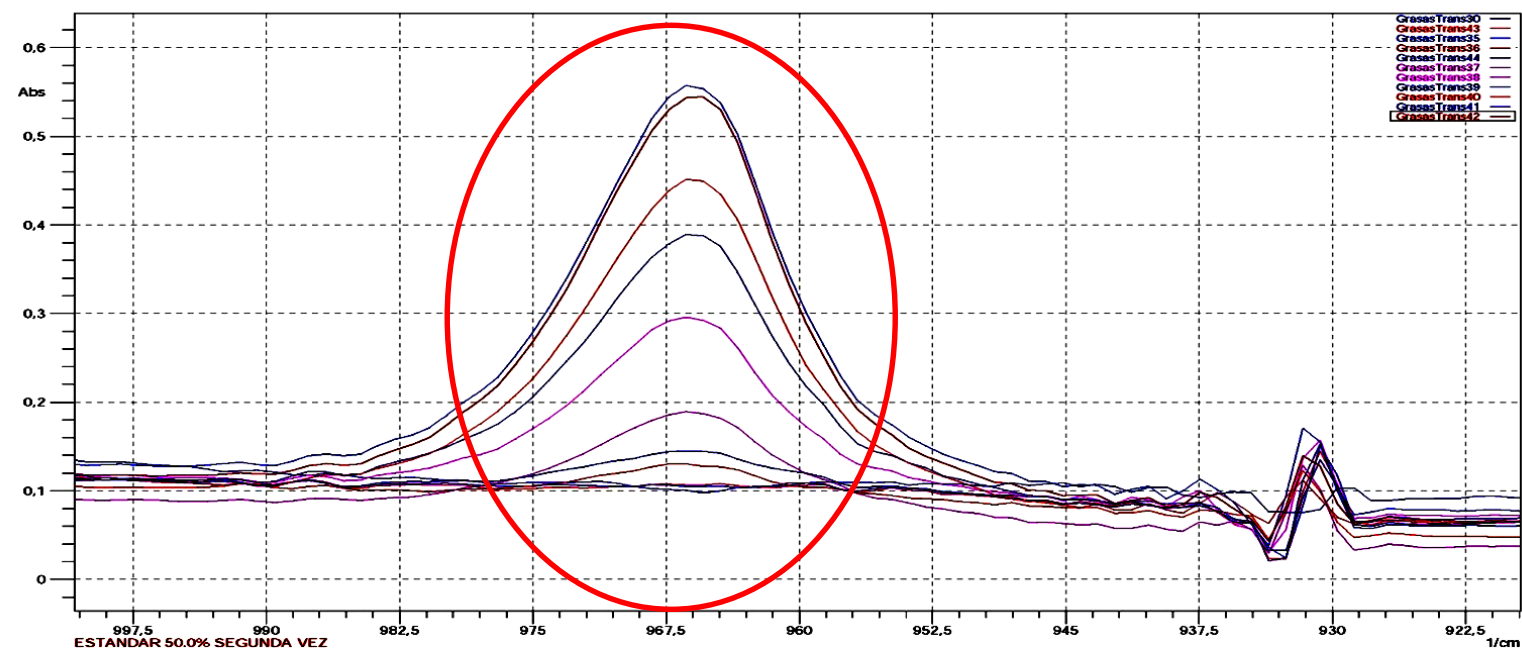
✓ **Coefficiente de variación de regresión**

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\tilde{y}} \cdot 100$$

$$CV_{y/x} = \frac{0.01054}{0.2739} \cdot 100 \quad CV_{y/x} = 0.0384812(100)$$

$$CV_{y/x} = 3.84$$

ANEXO N° 7
ESPECTRO INFRARROJO DE LOS ESTANDARES QUE CONFORMAN
LA CURVA DE CALIBRACION

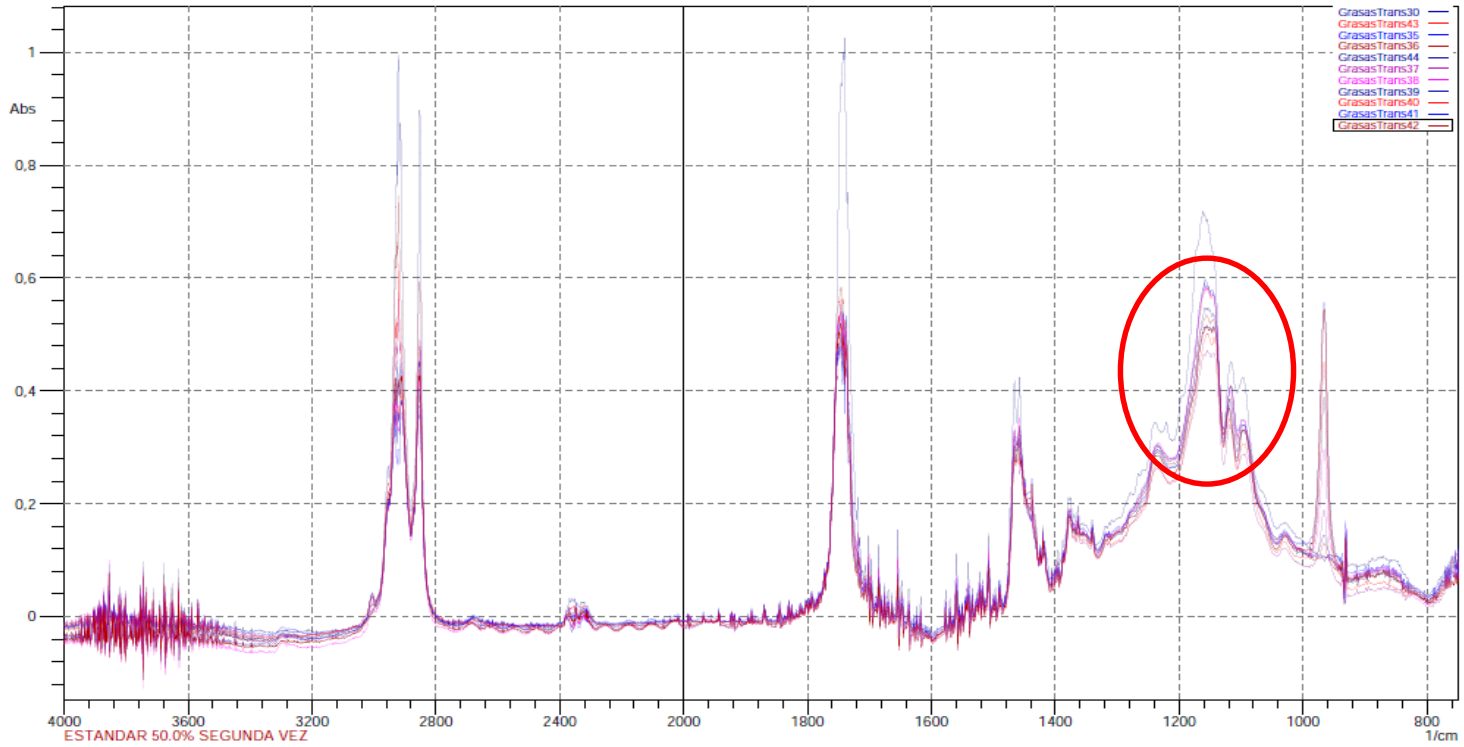


Comment:
 BLANCO EXACTITUD (FRANCESA)
 ESTANDAR 0.5% SEGUNDA LECTURA
 ESTANDAR 1.0%

No. of Scans; 64
 Resolution; 2 [1/cm]
 2 [1/cm]
 64

Date/Time; 21/05/2014 10:41:39
 User; Admin
 Admin
 21/05/2014 14:08:55

Figura N°8. Acercamiento del Espectro Infrarrojo de los estándares que conforman la Curva de Calibración



Comment:
 BLANCO EXACTITUD (FRANCESA)
 ESTANDAR 0.5% SEGUNDA LECTURA
 ESTANDAR 1.0%

No. of Scans; 64
 Resolution; 2 [1/cm]
 2 [1/cm]
 64

Date/Time; 21/05/2014 10:41:39
 User; Admin
 Admin
 21/05/2014 14:08:55

Figura N°9. Espectro Infrarrojo de los estándares q conforman la Curva de Calibración

ANEXO N° 8
CALCULOS DE PRECISIÓN

Precisión del método para margarina Dany. Ver Tabla N°4

Analista 1

- ✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{13.631 + 13.853 + 13.458 + 13.596 + 13.014 + 13.062}{6} \quad \bar{Y} = \frac{80.614}{6} \quad \bar{y} = 13.44$$

- ✓ Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{6(1083.6588) - (80.614)^2}{6(6-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{3.335804}{30}}$$
$$s = \sqrt{0.111193466} \quad s = 0.33$$

- ✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{\delta}{\gamma} * 100 \quad CV = \frac{0.33}{13.44} * 100 \quad CV = 0.02455 * 100 \quad CV = 2.45$$

Analista 2

- ✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{26.441 + 26.004 + 26.018 + 26.290 + 26.112 + 24.159}{6} \quad \bar{Y} = \frac{155.024}{6} \quad \bar{Y} = 25.84$$

- ✓ Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{6(4008.9271) - (155.02)^2}{6(6-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{22.3622}{30}} \quad s = \sqrt{0.74540666}$$
$$s = 0.86$$

- ✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.86}{25.84} * 100 \quad CV = 0.033281733 * 100 \quad CV = 3.33$$

Precisión del método para margarina Cremy. Ver Tabla N° 5

Analista 1

- ✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{31.699 + 30.522 + 30.814 + 30.258 + 29.261 + 29.808}{6} \quad \bar{Y} = \frac{182.362}{6} \quad \bar{y} = 30.39$$

- ✓ Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{6(5546.1912) - (182.362)^2}{6(6-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{21.248156}{30}}$$
$$s = \sqrt{0.708271866} \quad s = 0.84$$

- ✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.84}{30.39} * 100 \quad CV = 0.02764 * 100 \quad CV = 2.76$$

Analista 2

- ✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{23.575 + 22.965 + 23.480 + 23.656 + 23.406 + 24.843}{6} \quad \bar{Y} = \frac{141.925}{6} \quad \bar{Y} = 23.65$$

- ✓ Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{6(3359.1041) - (141.925)^2}{6(6-1)}} \quad s = \sqrt{\frac{11.918975}{30}} \quad s = \sqrt{0.397299}$$
$$s = 0.63$$

- ✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.63}{23.65} * 100 \quad CV = 0.026638477 * 100 \quad CV = 2.66$$

Precisión del método para margarina Suly. Ver Tabla N° 6

Analista 1

✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{116.863 + 16.949 + 16.526 + 16.491 + 16.155 + 16.480}{6} \quad \bar{Y} = \frac{99.464}{6} \quad \bar{Y} = 16.58$$

✓ Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{6(1649.2656) - (99.464)^2}{6(6-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{2.506304}{30}} \quad S = \sqrt{0.083543466}$$
$$S = 0.29$$

✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.29}{16.58} * 100 \quad CV = 0.017490952 * 100 \quad CV = 1.75$$

Analista 2

✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{21.612 + 21.296 + 21.700 + 20.605 + 20.676 + 20.522}{6} \quad \bar{Y} = \frac{126.411}{6} \quad \bar{Y} = 21.0685$$

✓ Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{6(2664.7036) - (126.411)^2}{6(6-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{8.480679}{30}}$$
$$S = \sqrt{0.2826893} \quad S = 0.53$$

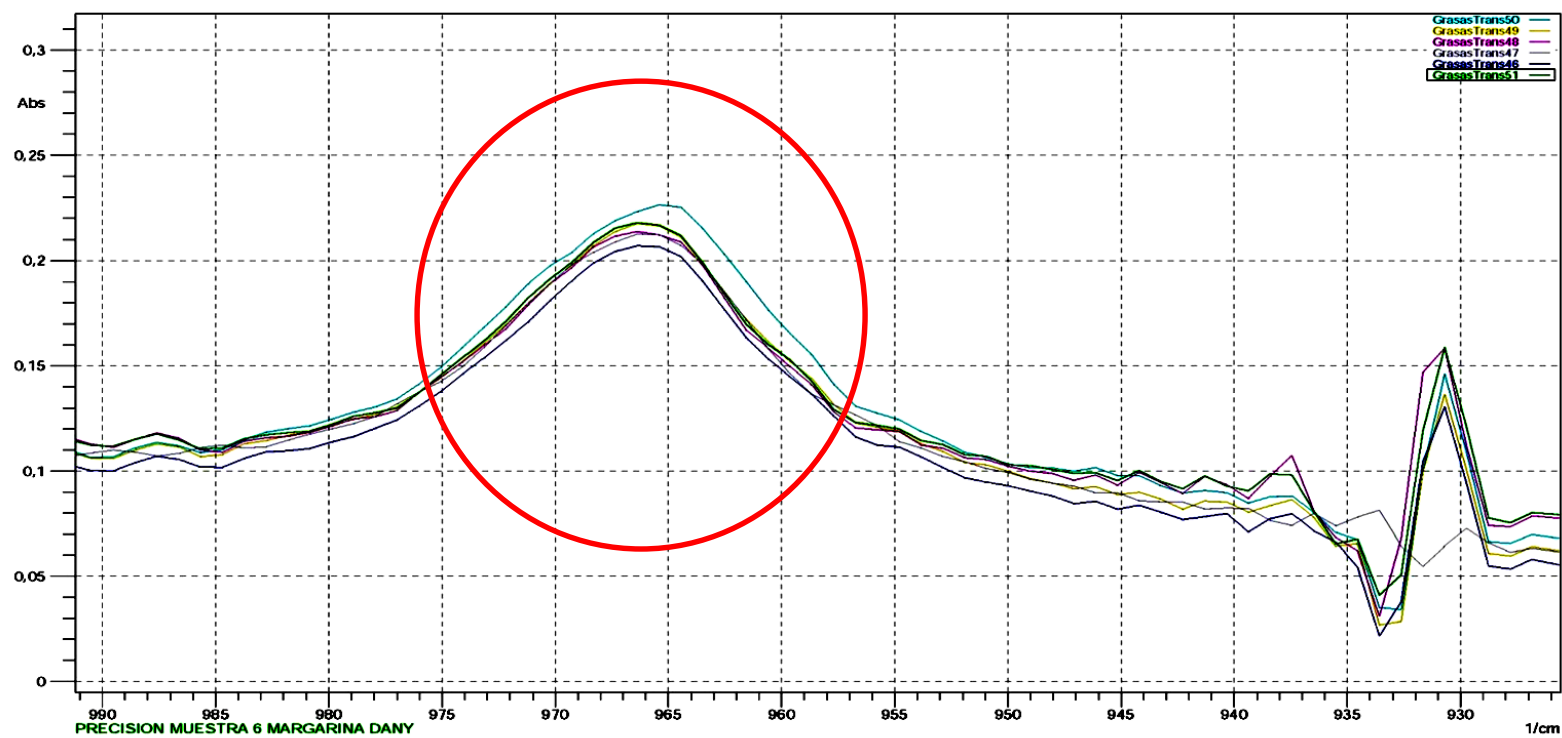
✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.53}{21.0685} * 100 \quad CV = 0.0251560 * 100 \quad CV = 2.52$$

ANEXO N° 9
ESPECTROS INFRARROJOS COMBINADOS PARA EL CALCULO DE
PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MARGARINA DANY

PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MARGARINA DANY

SHIMADZU



Comment;
PRECISION MUESTRA 1MARGARINA DANY
PRECISION MUESTRA 5 MARGARINA DANY
PRECISION MUESTRA 4 MARGARINA DANY

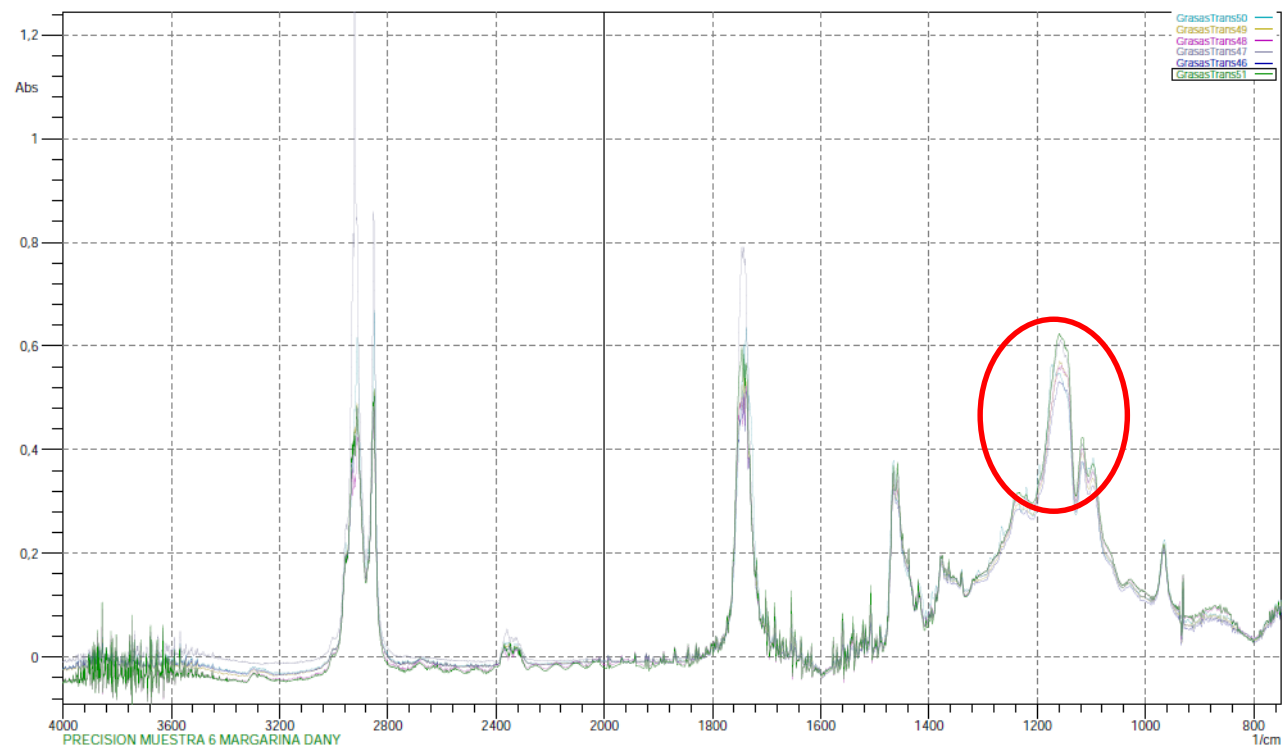
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 21/05/2014 15:31:34
User; Admin
Admin
21/05/2014 15:18:04

Figura N°10. Acercamiento del espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Dany

PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MARGARINA DANY

SHIMADZU



Comment:
PRECISION MUESTRA 1MARGARINA DANY
PRECISION MUESTRA 5 MARGARINA DANY
PRECISION MUESTRA 4 MARGARINA DANY

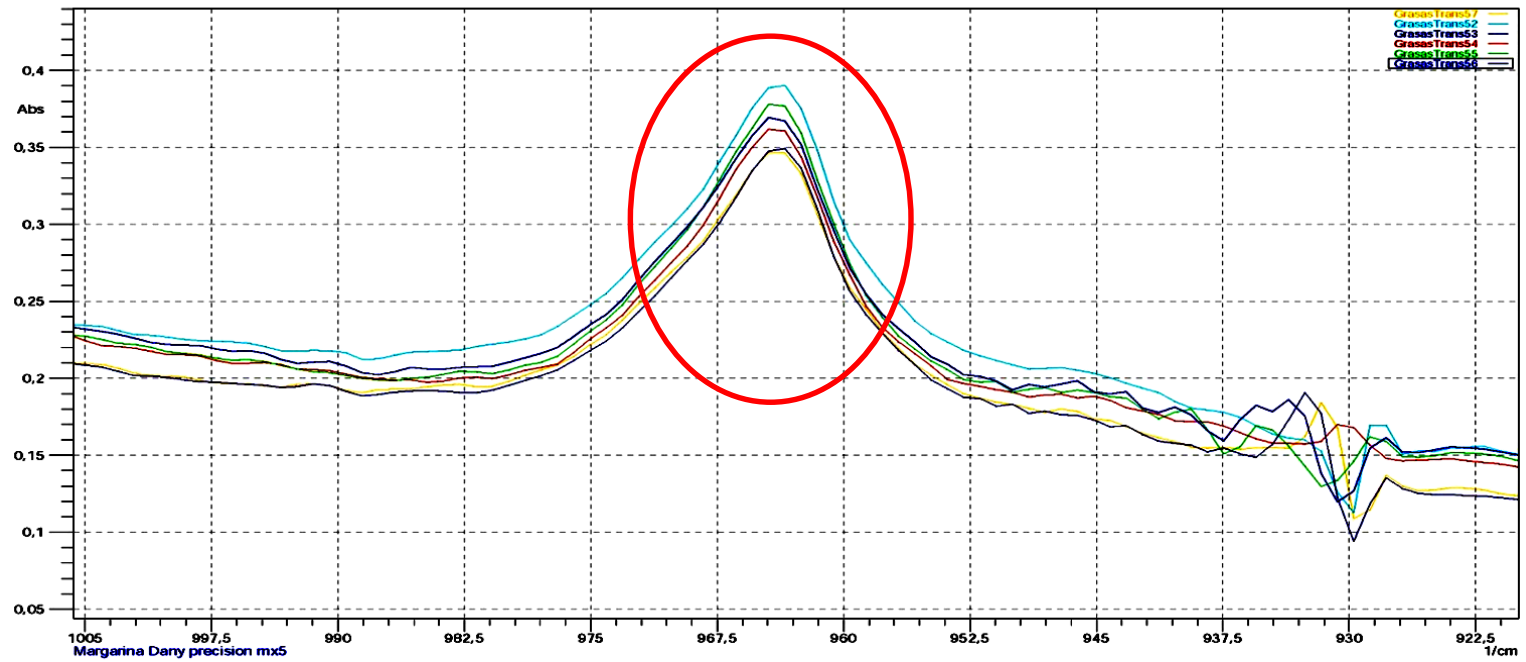
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 21/05/2014 15:31:34
User; Admin
Admin
21/05/2014 15:18:04

Figura N°11. Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Dany

ANEXO N° 10
ESPECTROS INFRARROJOS COMBINADOS PARA EL CÁLCULO DE
PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO DE MARGARINA DANY

PRESICION INTERMEDIA MARGARINA DANY



Comment;
Margarina Dany precision mx6
Margarina Dany precision mx1
Margarina Dany precision mx2

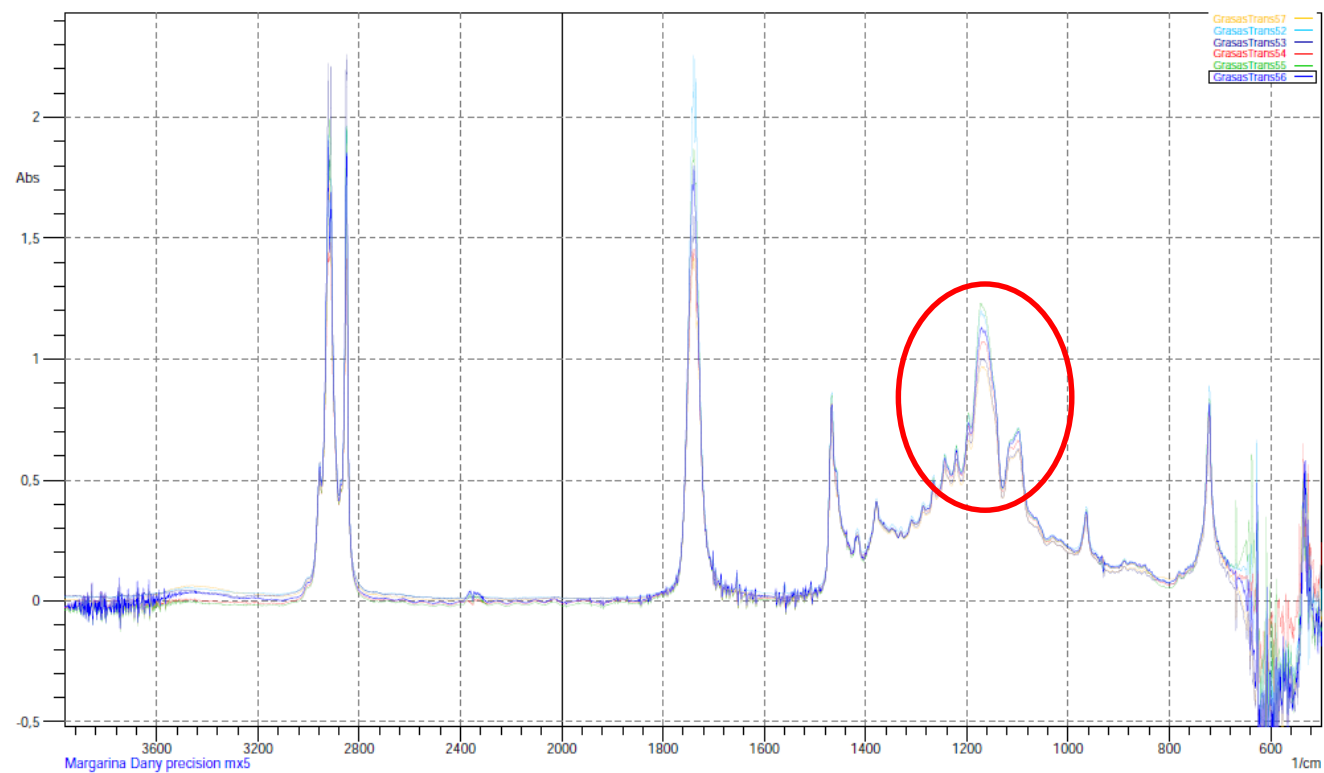
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 04/06/2014 9:37:50
User; Admin
Admin
04/06/2014 9:12:32

Figura N°12. Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Dany

PRESICION INTERMEDIA MARGARINA DANY

SHIMADZU



Comment:
Margarina Dany precision mx6
Margarina Dany precision mx1
Margarina Dany precision mx2

No. of Scans: 64
Resolution: 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

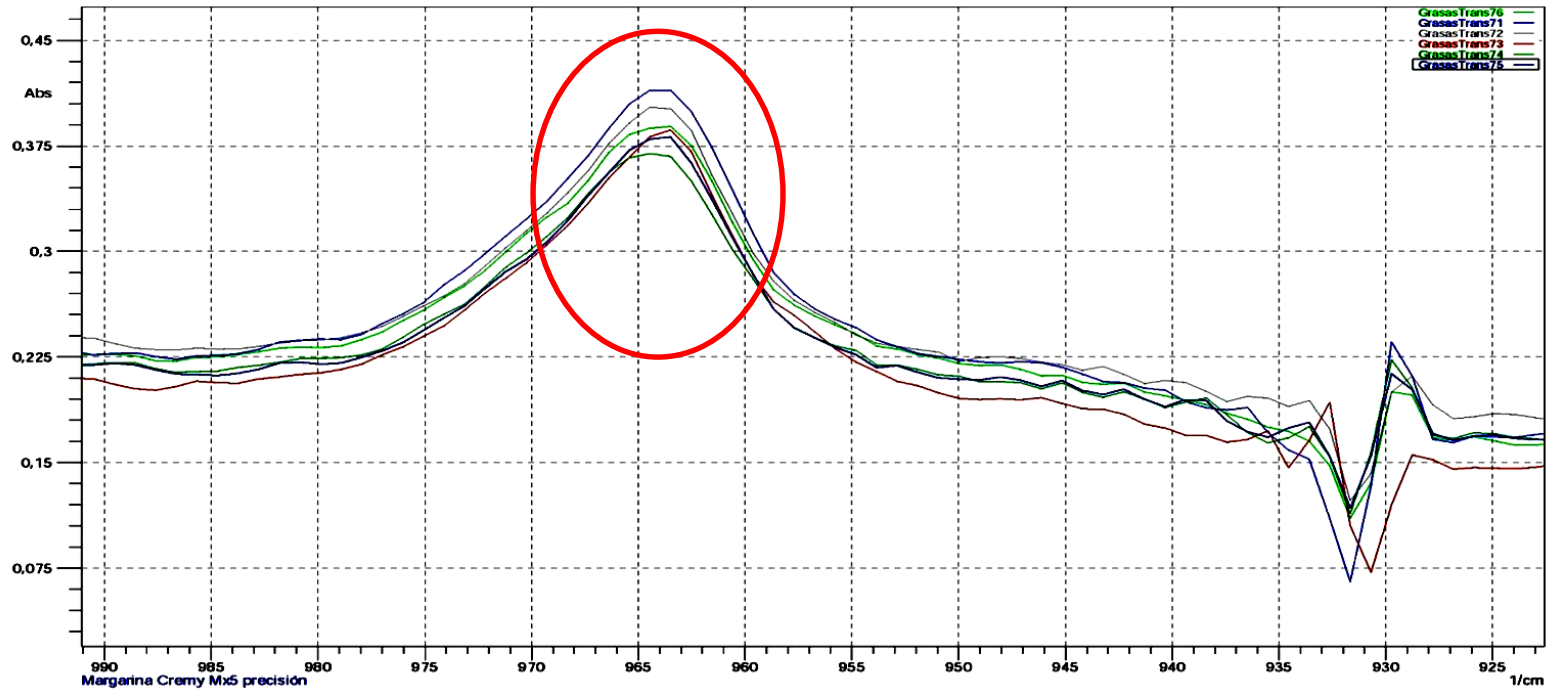
Date/Time: 04/06/2014 9:37:50
User: Admin
Admin
04/06/2014 9:12:52

Figura N°13. Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Dany

ANEXO N° 11
ESPECTROS INFRARROJOS COMBINADOS PARA EL CALCULO DE
PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MARGARINA CREMY

PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MARGARINA CREMY

SHIMADZU



Comment:
Margarina Cremy Mx6 precisi□
Margarina Cremy Mx1 precisi□
Margarina Cremy Mx2 precisi□

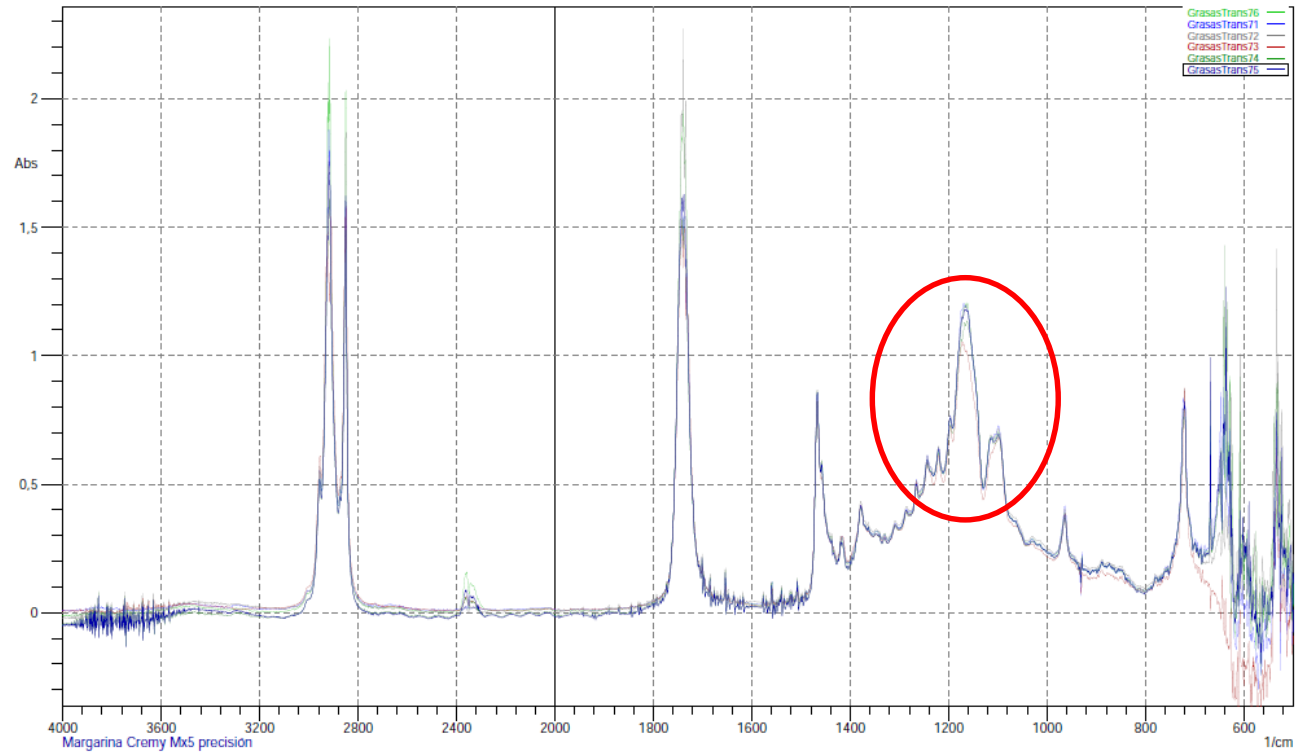
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 06/06/2014 9:35:10
User; Admin
Admin
06/06/2014 8:57:35

Figura N°14. Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Cremy

PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MARGARINA CREMY

SHIMADZU



Comment:
Margarina Cremy Mx6 precisi□
Margarina Cremy Mx1 precisi□
Margarina Cremy Mx2 precisi□

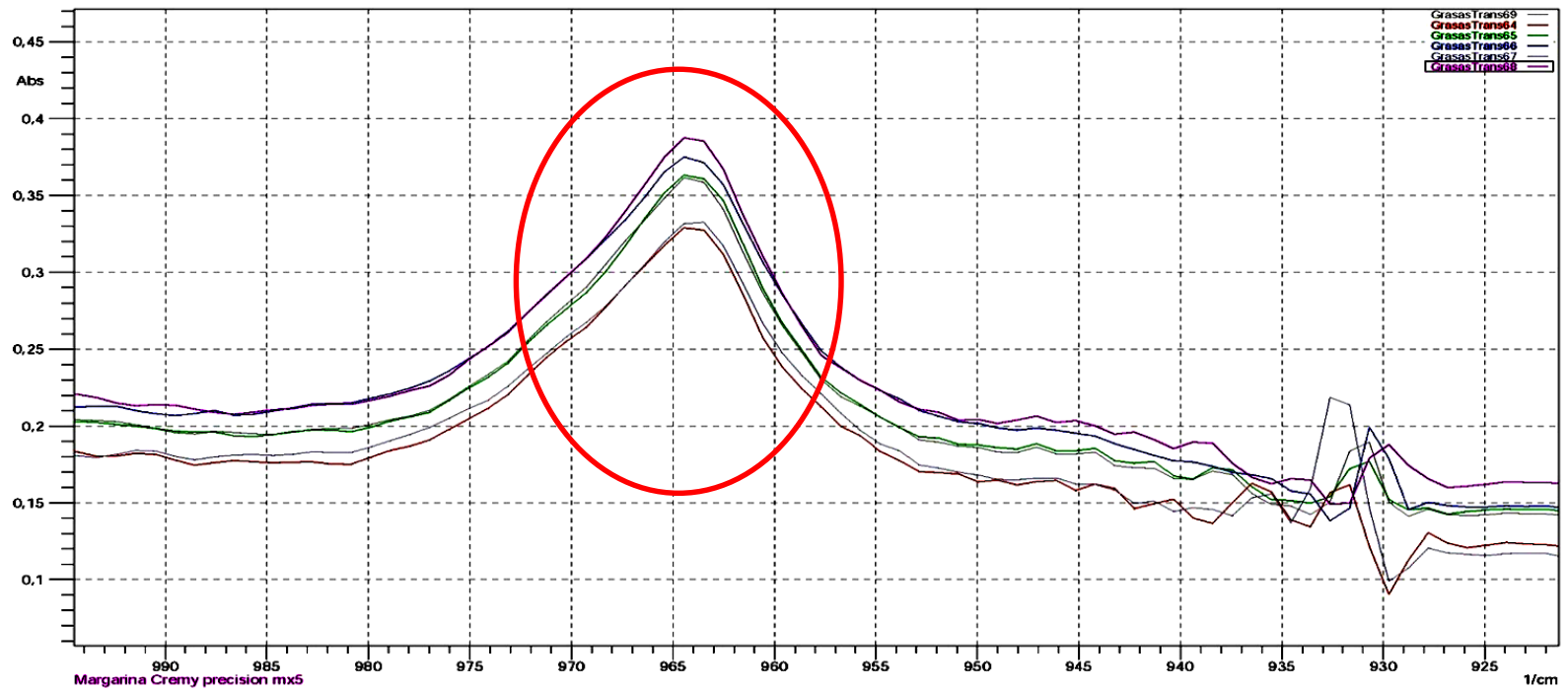
No. of Scans: 64
Resolution: 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time: 06/06/2014 9:35:10
User: Admin
Admin
06/06/2014 8:57:35

Figura N°15. Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Cremy

ANEXO N° 12
ESPECTROS INFRARROJOS COMBINADOS PARA EL CALCULO DE
PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO DE MARGARINA CREMY

PRECISIÓN INTERMEDIA MARGARINA CREMY



Comment;
Margarina Cremy precision mx6
Margarina Cremy precision mx1
Margarina Cremy precision mx2

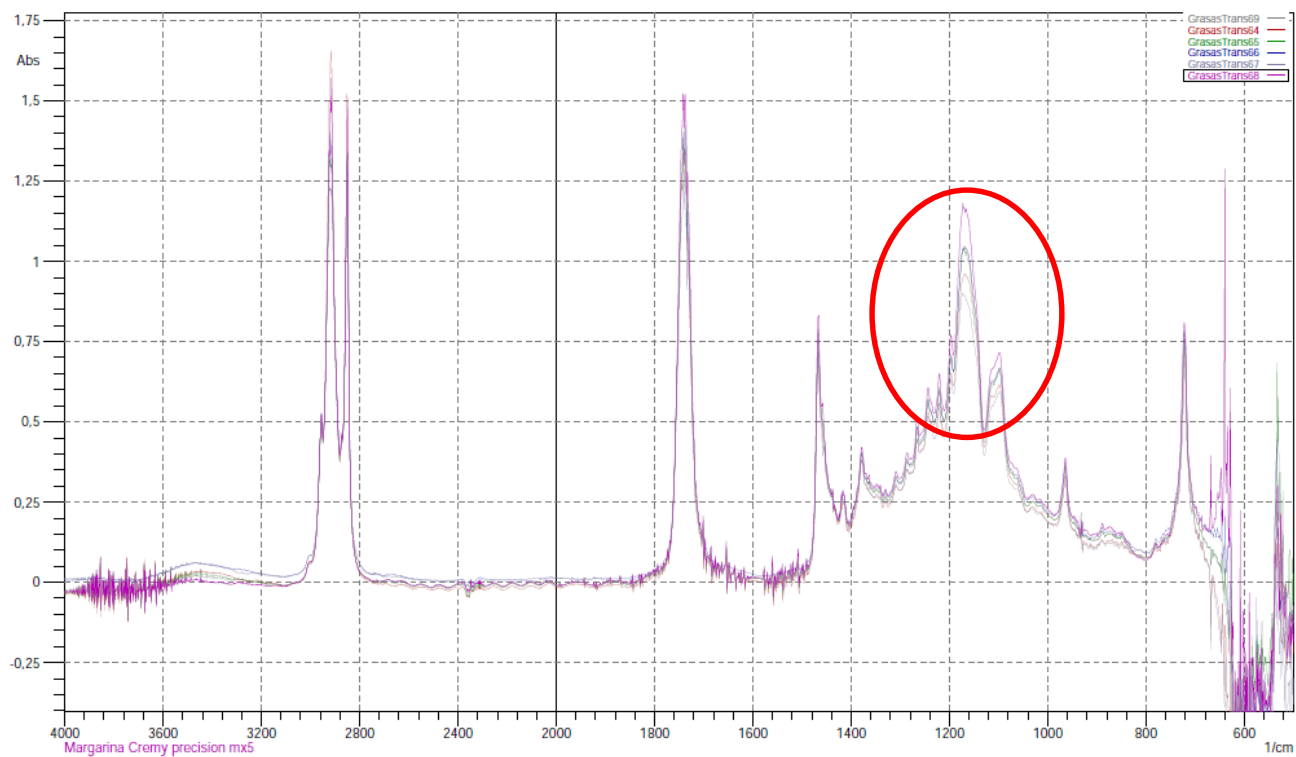
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 04/06/2014 11:05:08
User; Admin
Admin
04/06/2014 10:49:15

Figura N°16. Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Cremy

PRECISIÓN INTERMEDIA MARGARINA CREMY

SHIMADZU



Comment:
Margarina Cremy precision mx6
Margarina Cremy precision mx1
Margarina Cremy precision mx2

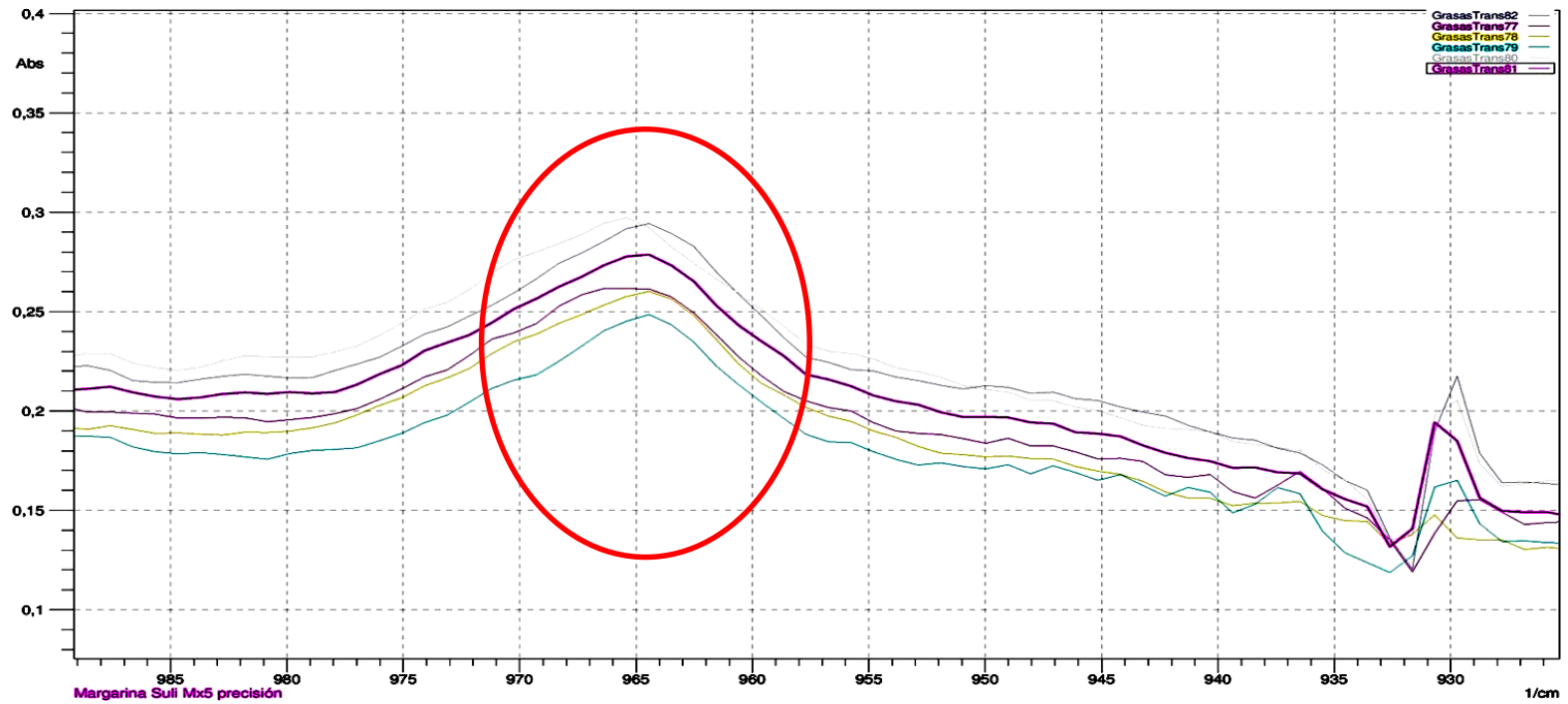
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 04/06/2014 11:05:08
User; Admin
Admin
04/06/2014 10:49:15

Figura N°17. Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Cremy

ANEXO N° 13
ESPECTROS INFRARROJOS COMBINADOS PARA EL CALCULO DE
PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MARGARINA SULLY

PRESICION DEL MÉTODO DE MARGARINA SULY



Comment:
Margarina Suly Mx6 precisi
Margarina Suly Mx1 precisi
Margarina Suly Mx2 precisi

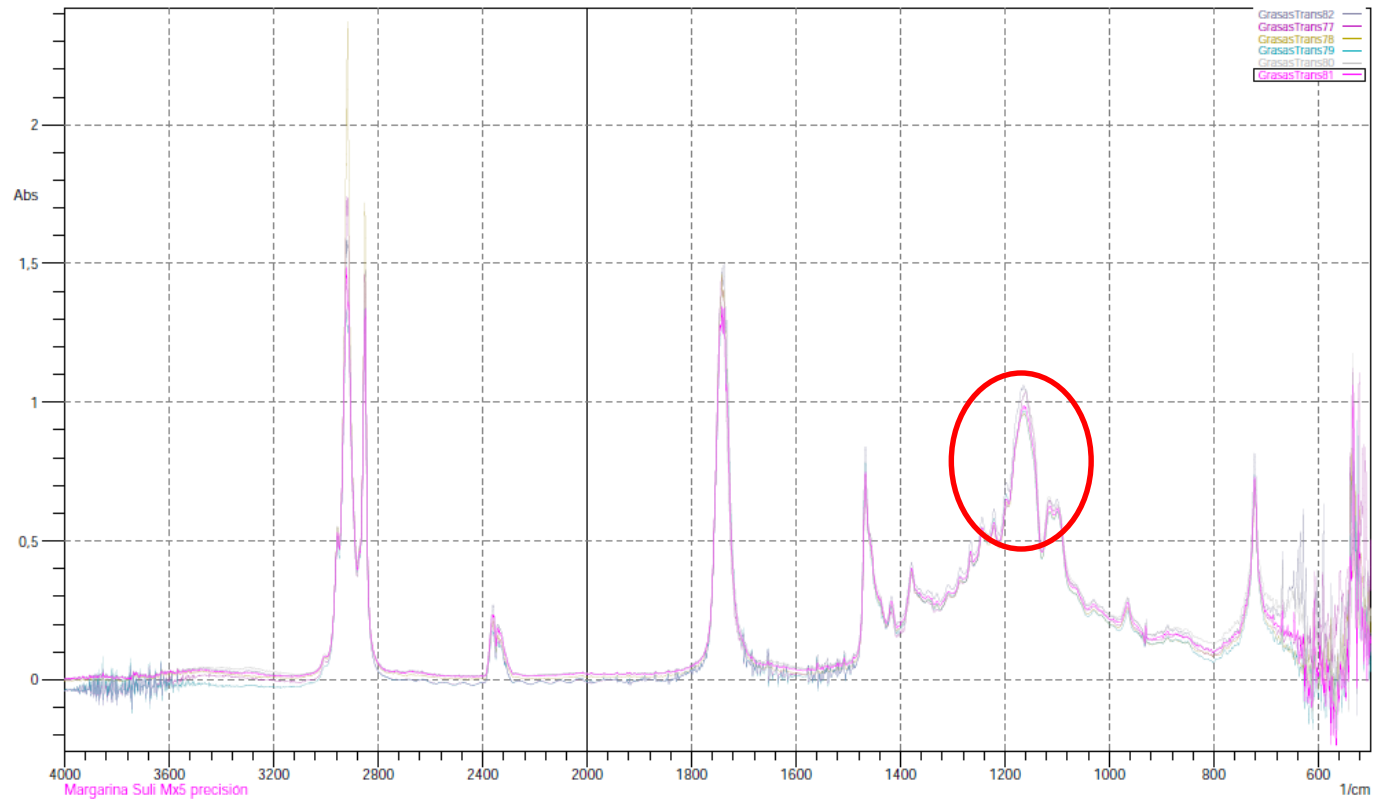
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 06/06/2014 10:38:33
User; Admin
Admin
06/06/2014 10:13:14

Figura N°18. Acercamiento del Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Suly

PRESICION DEL MÉTODO DE MARGARINA SULY

SHIMADZU



Comment:
Margarina Suly Mx6 precisi
Margarina Suly Mx1 precisi
Margarina Suly Mx2 precisi

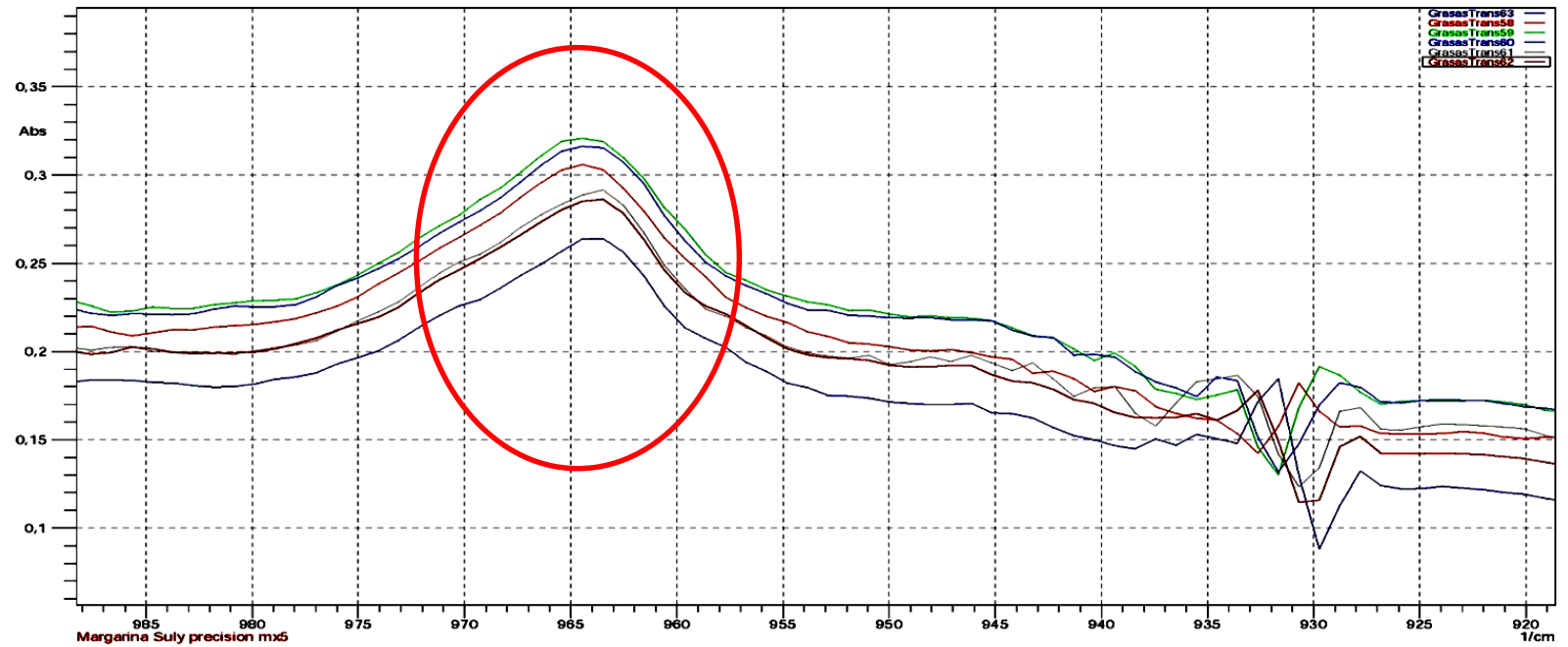
No. of Scans: 64
Resolution: 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time: 06/06/2014 10:38:33
User: Admin
Admin
06/06/2014 10:13:14

Figura N°19. Espectro Infrarrojo de resultados de Precisión del método de margarina Suly

ANEXO N° 14
ESPECTROS INFRARROJOS COMBINADOS PARA EL CALCULO DE
PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO DE MARGARINA SULLY

PRESICION INTERMEDIA MARGARINA SULY



Comment;
Margarina Suly precision mx6
Margarina Suly precision mx1
Margarina Suly precision mx2

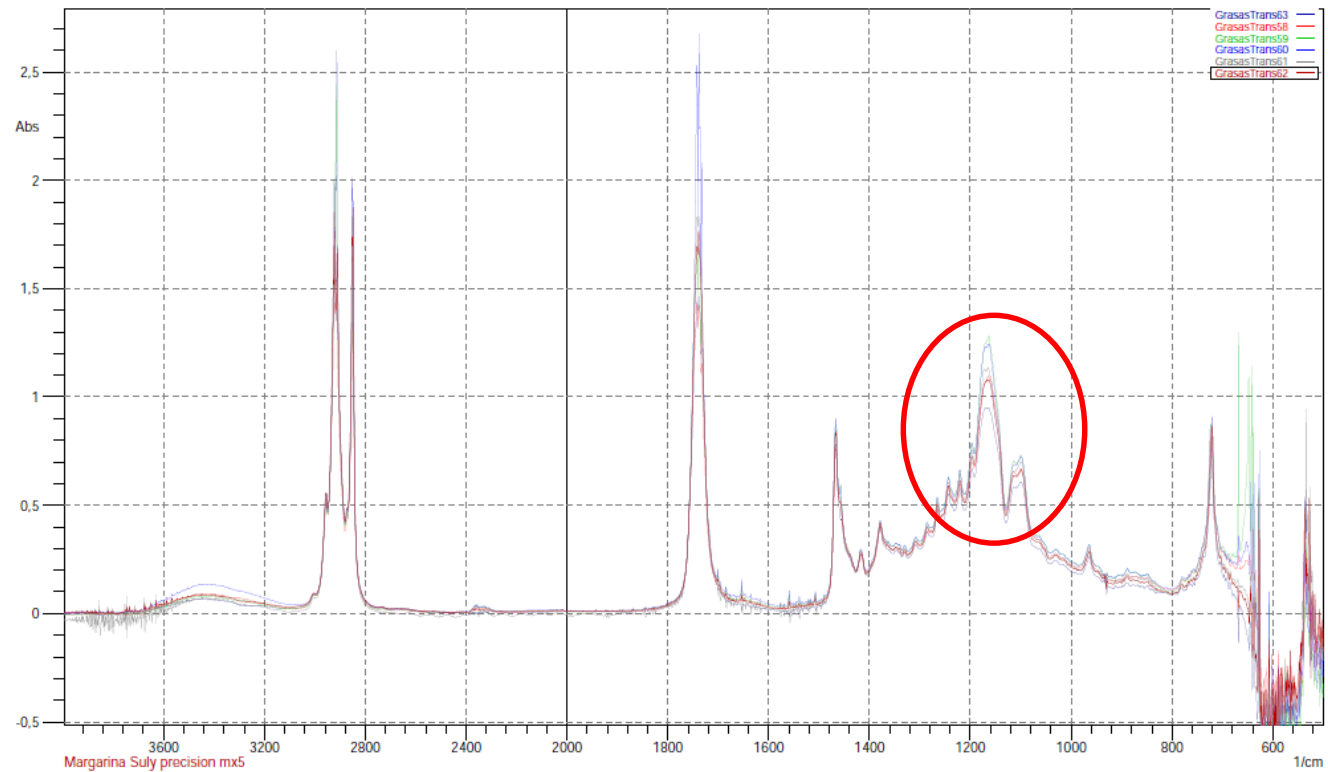
No. of Scans; 64
Resolution; 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time; 04/06/2014 10:24:15
User; Admin
Admin
04/06/2014 10:06:02

Figura N°20. Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Suly

PRESICION INTERMEDIA MARGARINA SULY

SHIMADZU



Comment:
Margarina Suly precision mx6
Margarina Suly precision mx1
Margarina Suly precision mx2

No. of Scans: 64
Resolution: 2 [1/cm]
2 [1/cm]
64

Date/Time: 04/06/2014 10:24:15
User: Admin
Admin
04/06/2014 10:06:02

Figura N°21. Espectros Infrarrojo de resultados de Precisión Intermedia margarina Suly

ANEXO N° 15
CALCULOS DE REPETIBILIDAD

Repetibilidad del método para margarina Dany. (Ver Tabla N°13)

✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{13.631 + 13.853 + 13.458 + 13.596 + 13.014 + 13.062}{6} \quad \bar{Y} = \frac{80.614}{6} \quad \bar{Y} = 13.44$$

✓ Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{6(1083.6588) - (80.614)^2}{6(6-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{3.335804}{30}}$$
$$S = \sqrt{0.111193466} \quad S = 0.33$$

✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.33}{13.44} * 100 \quad CV = 0.02455 * 100 \quad CV = 2.45$$

Repetibilidad del método para margarina Cremy. (Ver Tabla N° 14)

✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{31.699 + 30.522 + 30.814 + 30.258 + 29.261 + 29.808}{6} \quad \bar{Y} = \frac{182.362}{6} \quad \bar{Y} = 30.39$$

✓ Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{6(5546.1912) - (182.362)^2}{6(6-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{21.248156}{30}}$$
$$S = \sqrt{0.708271866} \quad S = 0.84$$

✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.84}{30.39} * 100 \quad CV = 0.02764 * 100 \quad CV = 2.76$$

Repetibilidad del método para margarina Suly. (Ver Tabla N° 15)

✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{Y} = \frac{116.863 + 16.949 + 16.526 + 16.491 + 16.155 + 16.480}{6} \quad \bar{Y} = \frac{99.464}{6} \quad \bar{Y} = 16.58$$

✓ Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{6(1649.2656) - (99.464)^2}{6(6-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{2.506304}{30}} \quad S = \sqrt{0.083543466}$$

$S = 0.29$

✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{0.29}{16.58} * 100 \quad CV = 0.017490952 * 100 \quad CV = 1.75$$

ANEXO N° 16
CALCULOS DE EXACTITUD

CALCULOS DE EXACTITUD

Exactitud del Método. (Ver Tabla N° 16)

✓ Media Aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad \gamma = \frac{1823.66}{18} \quad \bar{Y} = 101.31$$

✓ Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{18(184891.0035) - (1823.66)^2}{18(18-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{2302.2674}{306}}$$

$$s = \sqrt{7.523749} \quad S = 2.74$$

✓ Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{Y}} * 100 \quad CV = \frac{2.74}{101.31} * 100 \quad CV = 0.027045 * 100 \quad CV = 2.70$$

✓ Intervalo de Confianza de la media poblacional

$$IC_{(\mu)} = \bar{Y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad IC_{(\mu)} = 101.31 \pm 2.11 \frac{2.74}{\sqrt{18}} \quad IC_{(\mu)} = 101.31 \pm 2.11 \frac{2.74}{4.24}$$

$$IC_{(\mu)} = 101.31 \pm 2.11(0.6458) \quad IC_{(\mu)} = 101.31 \pm 1.36$$

$$IC_{(\mu)} = 99.95 \quad IC_{(\mu)} = 102.67$$