REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

"VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ETOXIQUINA EN HARINA DE PESCADO AREQUIPA 2013"

TRABAJO DE TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER:

KARIN ANDREA CARNERO CHIRINOS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESOR:

DR. JAIME CÁRDENAS GARCÍA, PHD.

AREQUIPA - PERÚ

2013

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ÍNDICE

Pg

I. CAPÍTULO I : GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN 1
OBJETIVOS 3
HIPÓTESIS 4

II. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. INDUSTRIA PESQUERA 5
2.1.1. Introducción 5
2.1.2. Harina de Pescado 5
2.1.3. Proceso de Producción de Harina de Pescado 7
A. Recepción de Materia Prima 7
B. Cocción 7
C. Prensado 8
D. Licor de Prensa 8
E. Evaporación de Agua de Cola 9
F. Secado 9
G. Molido 10
H. Adición de Antioxidante y Almacén 10

2.2. ETOXIQUINA 13
2.2.1. Síntesis de etoxiquina 14
2.2.2. Característica Fisicoquímicas 14
2.2.3. Mecanismo de Acción 15

2.3. DESTILACIÓN 16
2.3.1. Destilación al Vacío 16

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.4. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR 17

2.4.1. Fundamento 17

2.4.2. Apantallamiento o Protección Magnética 19

2.4.3. Desplazamiento Químico 20

2.4.4. Transformada de Fourier 21

2.5. AUTOOXIDACIÓN Y ANTIOXIDANTES 22

2.5.1. Radicales Libres 22

2.5.2. Autooxidación en Productos Alimenticios 22

A. Mecanismo de Autooxidación 23

B. Inhibición de la Autoxidación 24

2.5.3. Antioxidantes 25

2.5.4. Tipos de Antioxidantes 26

2.5.5. Antioxidantes Sintéticos 26

2.6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS 28

2.6.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC) 28

2.6.2. Cromatografía Liquida de Alta Resolución (HPLC) 30

A. Principios Generales 31

B. Instrumentos 31

2.7. VALIDACIÉN DE METODOS ANLÍTICOS 33

2.7.1. ¿Qué es Validación de un método? 33

2.7.2. ¿Por qué es necesaria la validación de un método? 34

2.7.3. ¿Cuándo se deben valorar los Métodos? 35

2.7.4. Estrategia para la Validación de Métodos 35

2.7.5. Metodología para la Validación de un Método Analítico 37

A. Selectividad 37

B. Linealidad y Rango 38

C. Exactitud 39

D. Precisión 41

E. Límite de Detección y Limite de Cuantificación 42

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

III. CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS 45

IV. CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 69

V. CONCLUSIONES 92

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 93

VII. ANEXOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

RESUMEN

La etoxiquina es un antioxidante sintético comúnmente usado para preservar vitaminas y lípidos que constituyen gran parte del contenido de alimentos para animales. Por otro lado se ha aprovechado su uso como agente preservante en cosechas de determinados frutos y también como preservante del color en condimentos. Durante el presente trabajo de tesis, se plantearon como propósitos desarrollar y validar una técnica Analítica que permita la determinación de etoxiquina por HPLC y su consecuente cuantificación en muestras de harina de pescado.

En un principio el estándar de etoxiquina con el que se contaba para desarrollar la técnica, presentaba un porcentaje de pureza de 75%, por lo que era necesario una previa evaluación del mismo, se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) utilizando como fase móvil hexano y acetato de etilo (48:3). Como resultado se pudo apreciar la presencia de interferentes, lo que nos indicaba que el estándar de referencia no era el adecuado. Con el fin de obtener un estándar de etoxiquina adecuado para el desarrollo de la técnica analítica se llevó a cabo la purificación del mismo, utilizando el método de destilación al vacío.

Una vez que se obtuvo el nuevo producto, se evaluó nuevamente usando cromatografía de capa fina (TLC), observando en la placa cromatográfica la ausencia de los interferentes que aparecieron en el primer TLC, lo que indicaba que el nuevo estándar de etoxiquina presentaba un nivel de pureza mayor y por lo tanto aceptable para el desarrollo de la técnica analítica.

Luego se llevó a cabo un análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), permitiendo identificar al nuevo estándar y confirmar la ausencia de interferentes. Así como también se determinó el grado de pureza del nuevo estándar (94%), permitiendo el desarrollo de la técnica analítica por HPLC para la determinación de etoxiquina en harina de pescado, y la validación de la misma con la finalidad de reportar resultados confiables.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Se verifico la idoneidad del sistema encontrándose que las condiciones de trabajo eran las adecuadas, se procedió a evaluar los parámetros de: Linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, y selectividad de la técnica propuesta, para así poder cuantificar la etoxiquina en nuestras muestras de harina de pescado, para la cual se utilizó una columna Discovery ® RP C18, fase móvil acetonitrilo: buffer fosfato (70:30) y una longitud de onda de 357nm.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN

La Etoxiquina es un antioxidante sintético, definido por la FDA, como conservador alimenticio que retarda el deterioro, rancidez o decoloración debido a la oxidación lipídica. Dado su alto nivel de efectividad y bajo costo es utilizado en muchos productos destinados a la alimentación de animales y su uso más común se da en la producción de harina y aceite de pescado.

El Método Oficial (AOAC) para la determinación de etoxiquina, ha existido desde 1963; en un principio la determinación de Etoxiquina en alimentos para animales por el Método Fluorométrico requería de una mayor cantidad de muestra, así como también de reactivos necesarios para la extracción líquida de dicha muestra. Otro método para determinación de este compuesto fue publicado en 1968 para la determinación de Residuos de etoxiquina en tejido animal – Método Fluorométrico, el cual también requiere de varias extracciones líquidas así como de un Fotofluorómetro; este método no ha sido adoptado dentro del uso oficial, hasta ahora.

Por último tenemos un Método Oficial (AOAC) de 1996, para determinación de etoxiquina en alimentos, por HPLC. Este método requiere de menos cantidad de muestra, así como también de reactivos y se usa un detector de fluorescencia con el que no siempre se cuenta con este tipo de instrumental.

Basándonos en ciertos puntos de este último método, se ha desarrollado una técnica analítica, para la determinación de etoxiquina por HPLC utilizando un detector UV, en muestras de harina de pescado, que es el ingrediente principal en el proceso de producción de alimentos para animales y requiere concentraciones de etoxiquina mucho más altas (hasta 750 ppm), para su adecuada conservación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Usando una técnica por HPLC con detector UV se podrán obtener resultados confiables en menos tiempo, contando con equipos y materiales que son de uso diario, en un Laboratorio de Control de Calidad, que no suele realizar análisis rutinarios para la determinación de Etoxiquina.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

OBJETIVOS

- Purificar e identificar un estándar de mayor pureza a partir del estándar de etoxiquina (75%), sin que se vea afectada la composición del mismo.

- Desarrollar y validar una técnica analítica por HPLC, cumpliendo con los parámetros exigidos por normativas internacionales.

- Cuantificar etoxiquina en diferentes muestras de harina de pescado, producidas comercialmente.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

HIPÓTESIS

Dentro de las competencias del Químico Farmacéutico se encuentra desarrollar procedimientos y técnicas analíticas, los que deben ser validados para su correcto empleo en el análisis químico. Es probable que se pueda desarrollar una técnica analítica por HPLC que cuantifique etoxiquina en muestras de harina de pescado.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. INDUSTRIA PESQUERA

2.1.1. INTRODUCCIÓN

La producción de harina y aceite de pescado constituye el principal método de aprovechamiento, de la captura mundial y del Perú, de pescado entero y de desperdicios procedentes de plantas de fileteo y de conservas.

En el Perú, la industria de harina de pescado es la segunda más grande después de la minería. Aproximadamente 130 plantas harineras cubren la línea costera peruana, procesando hasta 7.5 millones de toneladas de pescado en un buen año que se exportan casi en su totalidad.

2.1.2. HARINA DE PESCADO

La harina de pescado es un producto que se usa en la elaboración de alimentos balanceados para animales, como pollos, cerdos y otros.[1]

La alta calidad y concentración de nutrientes esenciales, especialmente de aminoácidos, ácidos grasos esenciales, y el contenido de energía hace de la harina de pescado un ingrediente indispensable en la dieta de la mayoría de las especies acuícola y muchos animales granja de la tierra.[1]

Debido al alto contenido de omega-3, la harina de pescado, es un "alimento funcional" natural, proporcionando beneficios saludables, para los animales de granja.

Productos cárnicos, leche y huevos de animales de granja alimentados con harina de pescado, con contenidos de omega-3 son, beneficiosos para la salud humana. [2]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

El 98% de materia prima para la elaboración de harina de pescado proviene de la anchoveta y la sardina entera, y una escasa cantidad del jurel otras especies de poco valor económico.

Las harinas pueden ser calificadas según su valor nutricional y biológico en súperprime, prime, tradicional y subproducto.[1]

La súper prime y prime se caracterizan por:

- Alto nivel de proteínas, en lo posible , superior a 68%
- Alta digestibilidad
- La materia prima a partir de la cual se produce la harina de pescado debe ser fresca. Por lo que debe presentar bajos niveles de total de bases volátiles nitrogenadas (TVN)
- Bajo nivel de cloruros.
- Ausencia de microorganismos patógenos como Salmonella, Shigella y hongos.
- Ausencia de toxinas, como la que causa el vómito negro o erosión de molleja.
- Producto homogéneo en cuanto a todas sus propiedades.
- Producto antioxidado (etoxiquina) en forma homogénea y en cantidad adecuada.
- Proceso de producción muy bien controlado, en especial en la etapa de secado.

2.1.3 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HARINA DE PESCADO

A. Recepción de Materia Prima [1,3]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Los pescados mas usados como MP, son de las especies de anchoveta y sardina. Llegadas las lanchas al puerto se acoderan en casetas flotantes, llamadas "chatas", provistas de bombas absorbentes.

Ya en la fábrica, el pescado bombeado llega a un desaguador, para eliminar el agua, luego es conducido por un transportador de malla a las tolvas que controlan el pesaje del pescado mediante una balanza electrónica.
Finalmente el pescado es almacenado en pozas de concreto armado.[3]

B. Cocción

De las pozas, el pescado es llevado por un transportador de rastra, que lo eleva y alimenta periódicamente ala tolva del coronador.[3]

La cocción del pescado debe realizarse tomando los siguientes controles:

- Evitar el daño térmico para conservar la capacidad integral de las proteínas.
- Usar secador indirecto.
- Menor tiempo y temperatura constante en el cocido.
- Sistema de alimentación automática.
- Sistema de control e inspección de la operación así como el de fácil limpieza.

Este parte del proceso consiste en la separación parcial de los tres principales componentes: sólidos, aceite y agua. Cuando el periodo se calienta alrededor de 100ºC, sus proteínas, lo que produce la ruptura de la membrana celular que da lugar a la liberación del aceite y del agua fisiológicamente ligada.

El pescado es cocinado a una temperatura de 100ºC con un tiempo aproximado de 20 minutos.[3]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La simple cocción libera una proporción importante de líquidos celulares que, con frecuencia, es superior al 60% del total de la materia prima.[1]

C. Prensado

Consiste en aprisionar el pescado cocido en prensas, para extraer aceite y agua de la carne de pescado.[3]

La mayor parte del líquido de cocción, se puede separar simplemente por drenaje. Por este procedimiento, antes del prensado, ya se elimina un líquido, compuesto por aceite y agua. La materia prima filtrada para a la prensa, y el resto de líquidos se van eliminando. La operación de prensado es un proceso continuo.[1]

Como producto del prensado, se obtiene licor de prensa, mas una torta o queke de prensa, el licor es bombeado y almacenado en u tanque, y la torta de prensa es sometida a secado.[3]

La torta que sale de la prensa contiene 55% de humedad y 3% a 4% de aceite.
La materia prima de mala calidad posee dos inconvenientes: resulta difícil de prensar y los líquidos de prensado son muy pastosos.[1]

D. Licor de prensa

Los líquidos del prensado están constituidos por una mezcla de agua, aceite y sólidos. La composición típica de un líquido de prensado podría ser: 78% de agua, 6% de sólidos y 16% de aceite.

El propósito de esta parte del proceso es separar lo mejor posible el aceite de la fracción acuosa y concentrar, seguidamente, por un procedimiento económico, los sólidos disueltos en agua, para añadirlos nuevamente al producto acabado.

Seguidamente, el líquido de prensado se separa en dos fracciones: el aceite y la fracción acuosa, conocida como “agua de cola”.[1]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

E. Evaporación del agua de cola

El "agua de cola" debe contener una proporción muy baja de aceite, menos del 0.5%, y puede contener tan solo un 5% de sólidos. Sin embargo representa alrededor del 50% de la materia prima. Aproximadamente el 20% de la harina final proviene de agua de cola. El agua de cola se concentra, generalmente, hasta un contenido en sólidos del 30%-50%.[1]

F. Secado

Antes del proceso de deshidratación la torta del prensado, posee un alto grado de humedad alrededor de 45% - 50%.[3]Aunque la deshidratación constituye sobre todo una operación sencilla, se requiere habilidad para conseguir, las condiciones adecuadas en el proceso.

Si la harina no esta suficientemente deshidratada, se puede producir el crecimiento de mohos y bacterias, y en consecuencia el valor nutritivo del producto se reduce. Si se deshidrata demasiado existe el riesgo de que se reduzca su valor nutritivo.[1]

Existen dos tipos de deshidratadores:

- Deshidratadores Directos: llamados a veces deshidratadores de llama, utilizan un flujo de aire muy caliente de 600ºC, el volteo de la torta se produce por el movimiento de rotación del deshidratador. Las partículas de harina no alcanzan las temperaturas tan elevadas, ya que la rápida evaporación del agua de la superficie de la torta provoca su enfriamiento al eliminarse el calor latente de evaporación. La harina normalmente no rebasa la temperatura de 80ºC.[1]

- Deshidratadores Indirectos: también son rotatorios, pero el calentamiento se suministra de forma indirecta, por contacto con discos, tubos, serpentines o por la propia pared del deshidratador calentando con vapor o aire. El aire utilizado generalmente, no es precalentado, y se mueve en dirección opuesta a la de la harina.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Este tipo de deshidratadores en esencia son recipiente que funcionan a presión, en ellos se suele utilizar vapor a una presión de 6 atmósferas, que corresponde a una temperatura de vapor de unos 170ºC. Los tiempos de permanencia de la harina en los indirectos son aproximadamente dos veces superiores que los directos, aproximadamente de 30 minutos por lo menos.

En todos los deshidratadores indirectos el proceso de deshidratación se controla por la temperatura del vapor (o la presión) y el tiempo de permanencia en este.[1]

Harinas de mayor valor biológico y mayor costo en el mercado se obtienen por métodos indirectos de secado.

G. Molido

Debido a que el producto de la deshidratación, contiene tamaño de partículas muy variadas, esta parte del proceso es indispensable para obtener un producto, con partículas uniformes.

El molino que se utiliza para este proceso es de tipo vertical y de martillos fijos.[3]El objeto del proceso del molido consiste en producir un polvo homogéneo exento de sustancias extrañas, y con buen aspecto.

Antes del molido se somete el producto a un cribado por vibración y a un campo magnético mediante el cual se elimina sustancias extrañas, como maderas, clavos, anzuelos o sacos de plástico.
La mayoría de los clientes exigen un tamaño de partícula entre 2 y 0.1 milímetros.[1]

H. Adición de Antioxidante y Almacén

Luego que la harina es molida , es succionada por un ventilador que la enfría y la transporta por un ducto, hacia la tolva del equipo dosificador de antioxidante , que

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

sirve para evitar la auto combustión de la harina, debido a la elevación de la temperatura por la presencia de grasa , en porcentajes elevado.[3]

El producto frecuentemente empleado para la estabilización de la harina de pescado es la etoxiquina, la concentración a la que se emplea depende de cada caso, pero suele oscilar entre 400mg/kg y 1.000mg/kg.[1]

La harina de pescado se envasa en sacos de propileno, ajustando el peso en balanzas, que entregan a los sacos cantidades prepesadas (50kg).[3] Durante el almacenamiento debe controlarse la temperatura con termómetros efectuando mediciones, cada tres metros, a un tercio de su altura, desde el suelo. La temperatura de las filas debe ser inferior a 35ºC .[1]

TABLA 2.1: Composición química de la harina de pescado [1]

Variable	Harina Estándar Contenido	Harina Especial Contenido
Proteínas	65% promedio	67% mínimo
Humedad	12% máximo	6%-10%
Grasa	12% máximo	12% máximo
Sal y arena	5% máximo	3% máximo
Cenizas (excluido NaCl)	16% máximo	14% máximo
Histamina	5.000 ppm máximo	1.000 ppm máximo
Digestibilidad	90% mínimo	90% mínimo
Nitrogeno volátil en materia prima	150 mg/100g	0.16 %

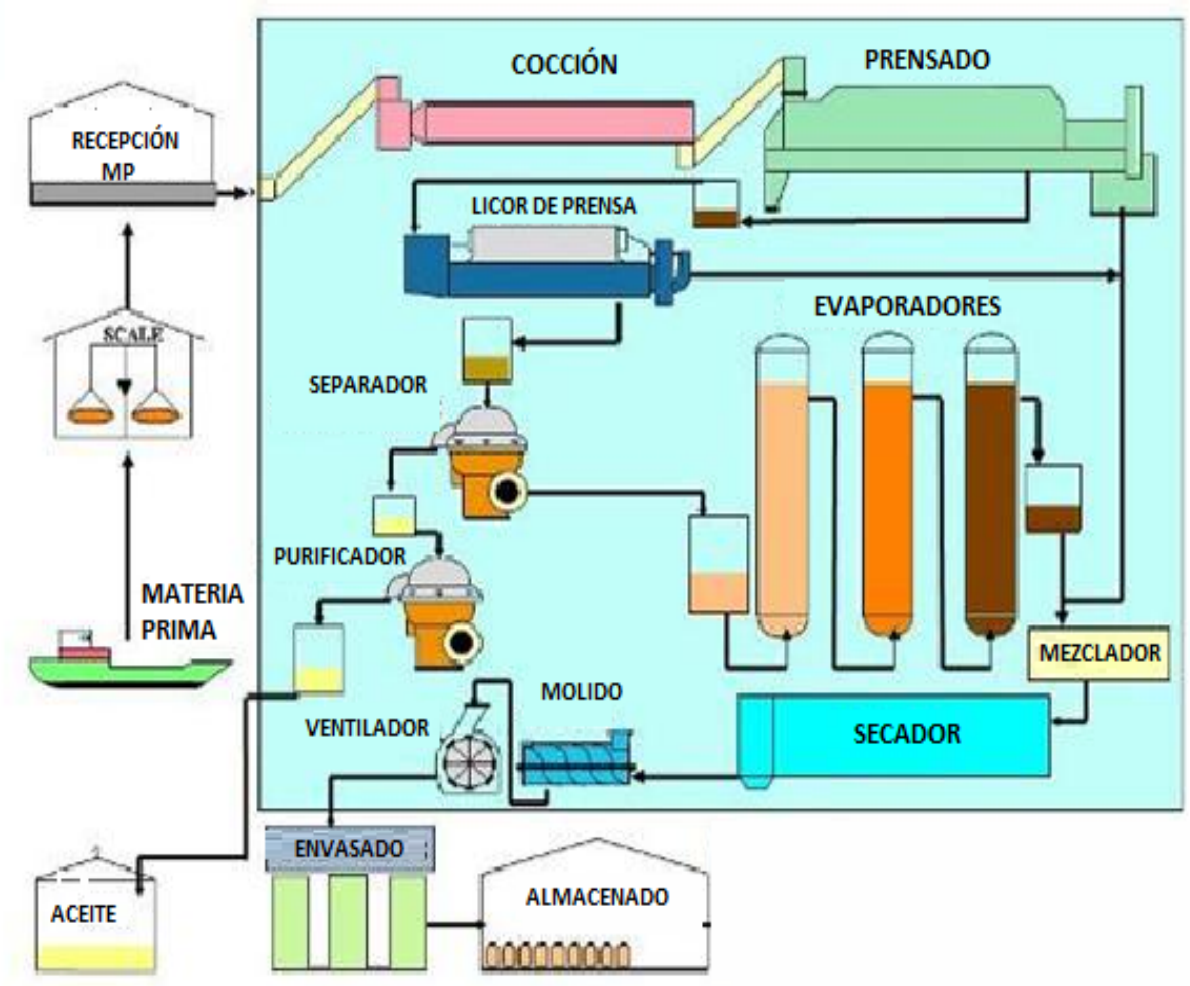
Fuente: FAO

Figura 2.1: Diagrama de Flujo del Proceso de Producción de Harina de Pescado

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



Fuente: FAO T142

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.2 ETOXIQUINA

Antioxidante sintético, comúnmente utilizado para proteger una variedad de sistemas de hidrocarburos insaturados.[4]

La corporación Monsato desarrollo la etoxiquina originalmente en 1950, como un agente antidegradante. Ha sido usado en precosecha y post cosecha (para prevenir escaldaduras en peras y manzanas), como insecticida, fungicida. Y posteriormente fue usado como antioxidante sintético en comida para perros, para prevenir la oxidación y ranciedad de las grasas.[5] Al principio FDA permitió el uso de etoxiquina como estabilizador en alfalfa, y otras hierbas utilizadas para el alimento del ganado, en una concentración de 150ppm (aunque en 1997 se redujo esta cantidad en 75ppm, en alimento para mascotas).

La etoxiquina no ha sido aprobada como preservativo, en alimentos para humanos, con la excepción de su uso en la retención del color en el páprika, en una concentración máxima de 100ppm. La Organización Mundial de Salud ha establecido que el límite de ingesta diaria de etoxiquina para seres humanos debe ser de 0.06mg/kg.[6]

La etoxiquina considerada el antioxidante con la mejor efectividad, combinado con la harina de pescado inmediatamente después de la producción, elimina el riesgo de combustión. Debido a que los alimentos para mascotas tienen un tiempo de vida útil largo, la etoxiquina ha sido una buena opción como antioxidante debido a su eficacia, durabilidad, y por ser económico, en comparación con otros antioxidantes (naturales).[7]

2.2.1. Características Fisicoquímicas[45]

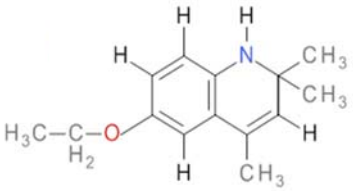
Consistência	: Liquida
Color	: Amarillo
Fórmula Molecular	: C14H19NO
Peso Molecular	: 217.31 g mol−1
Punto de Ebullición	: 123–125 °C (1-2 mmHg aprox.)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Nombre IUPAC : 6-etoxi-2,2,4-trimetil-1,2-dihidroquinolona



2.2.2. Síntesis de la Etoxiquina

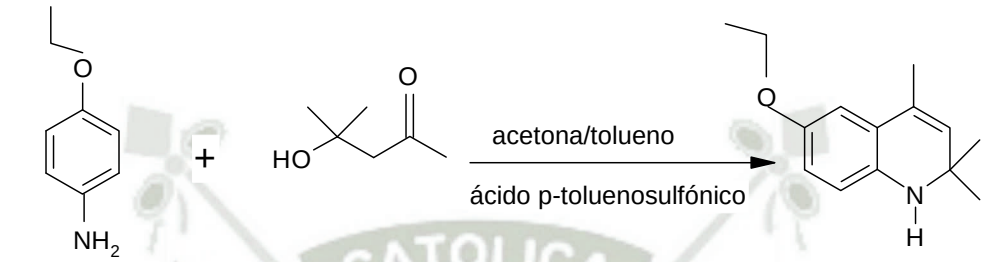


Figura 2.2: Síntesis de Etoxiquina

2.2.3. Toxicidad de la etoxiquina

La actual controversia rodea cuestiones relacionadas con su seguridad cuando se administran varias veces en cantidades permitidas en los alimentos para perros, la etoxiquina es fácilmente absorbida, metabolizada y excretada en la orina y las heces, con niveles residuales en el hígado , el tracto gastrointestinal y el hígado adiposo.[5]

Etoxiquina se le asigna una calificación de toxicidad de 3 o " moderadamente tóxico ", lo que indica que la dosis humana oral letal probable es de 0,5-5 g / kg , 3 a 33 veces el máximo permitido en los alimentos para mascotas , la exposición dérmica (Categoría III), y la inhalación (Categoría III), no es un irritante para los ojos (Categoría IV), y produce irritación mínima a la piel (Categoría IV).

Los principales órganos afectados por la etoxiquina en animales de experimentación son el hígado y los riñones, y los estudios indican que la etoxiquina no es un teratógeno o tóxico para el desarrollo en ratas o conejos. El aumento de grasa en la dieta, por ejemplo , aumenta la susceptibilidad a la toxicidad de etoxiquina.[6]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.2.4. Mecanismo de Acción

La etoxiquina realiza su acción protectora mediante su propia oxidación. Rompe la cadena de transferencia de energía oxidante, recibiendo pero no transmitiendo energía. Algunos de sus productos de oxidación poseen también propiedades antioxidantes.[8] Esto quiere decir que a pesar de encontrarse en estado insaturado, continua inhibiendo la oxidación.[9]

El primer producto de oxidación de la etoxiquina es 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline.[10]

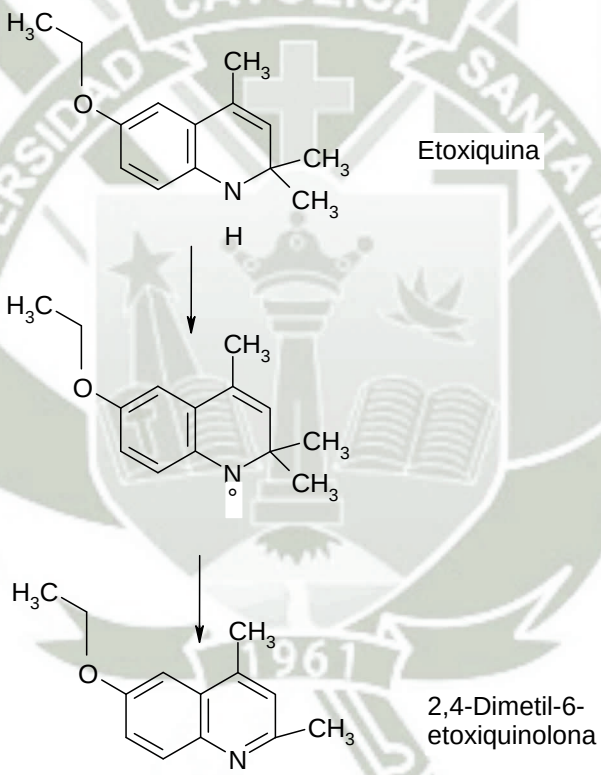


Figura 2.3: Proceso de Oxidación de Etoxiquina

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.3 DESTILACIÓN

El proceso de destilación constituye un método excelente para purificar un líquido estable en su punto de ebullición. La técnica puede adaptarse también para materiales inestables en las cercanías de sus puntos de ebullición.
La destilación es un método especialmente valiosos a efectos de purificación porque pueden aplicarse con relativa facilidad a gran cantidad de muestras liquidas; además el único "reactivo" adicional que interviene en la destilación es el calor. [11]

Es un proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. Su objetivo principal es separar una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles, con lo cual se consigue un producto de mayor concentración.[12]

2.3.1. Destilación al Vacío

Es una forma de destilación (sencilla o fraccionada) que se efectúa a presión reducida.

Muchas sustancias no pueden purificarse por destilación a presión atmosférica porque se descomponen antes de alcanzar sus puntos de ebullición normales.
Otras sustancias tienen puntos de ebullición tan altos que su destilación es difícil o no resulta conveniente. En estos casos se emplea la destilación a presión reducida.[13]

La destilación a presión reducida o al vacío consiste en disminuir la presión en el montaje de destilación con la finalidad de provocar una disminución del punto de ebullición del componente que se pretende destilar. Cuanto mayor es el grado de vacío, menor es la temperatura de destilación. [14, 15]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

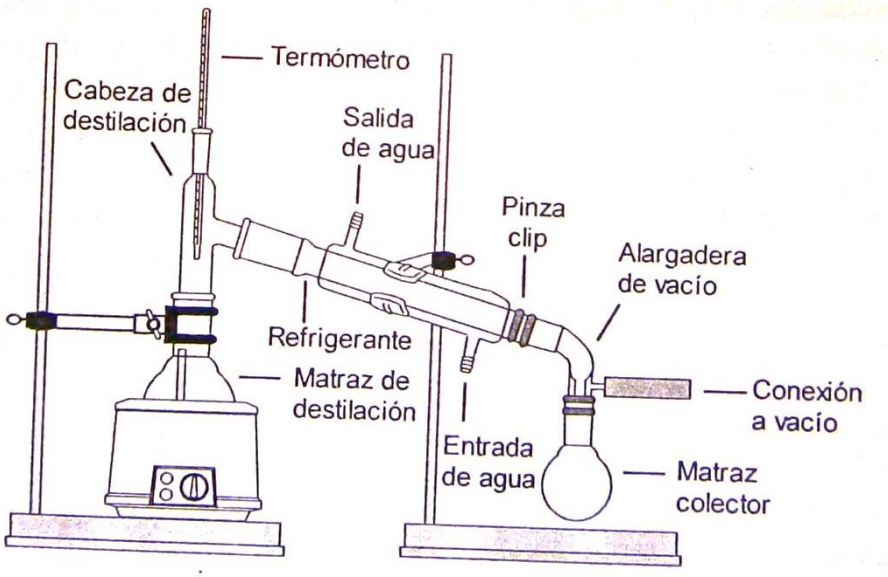


Figura 2.4: Equipo de Destilación al Vacío

2.4. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

2.4.1. Fundamento

La Espectroscopia de RMN se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética. Están implicados los núcleos de los átomos en vez de electrones exteriores.[16] Produce un "mapa" de la estructura de carbonos e hidrógenos de una molécula orgánica[17]

Es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posibles la absorción[16].

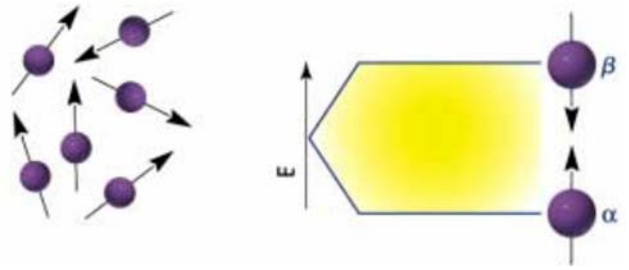
En ausencia de un campo magnético externo, los giros de los núcleos magnéticos se orientan al azar. Cuando se coloca una muestra con esos núcleos entre los polos de un imán potente, los núcleos adoptan orientaciones especificas[17].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

(a) (b)



(a) Los espines o giros nucleares se orientan al azar en ausencia de un campo magnético externo, pero (b) tienen una orientación especifica en presencia de un campo externo (E).

Se puede orientar un núcleo con spin nuclear de 1H, 13C, de tal manera que su diminuto campo magnético este alienado con el campo externo (paralelo al mismo) o también en contra (antiparalelo al campo). Las dos orientaciones tienen energía distinta, la orientación paralela posee menos energia.[17]

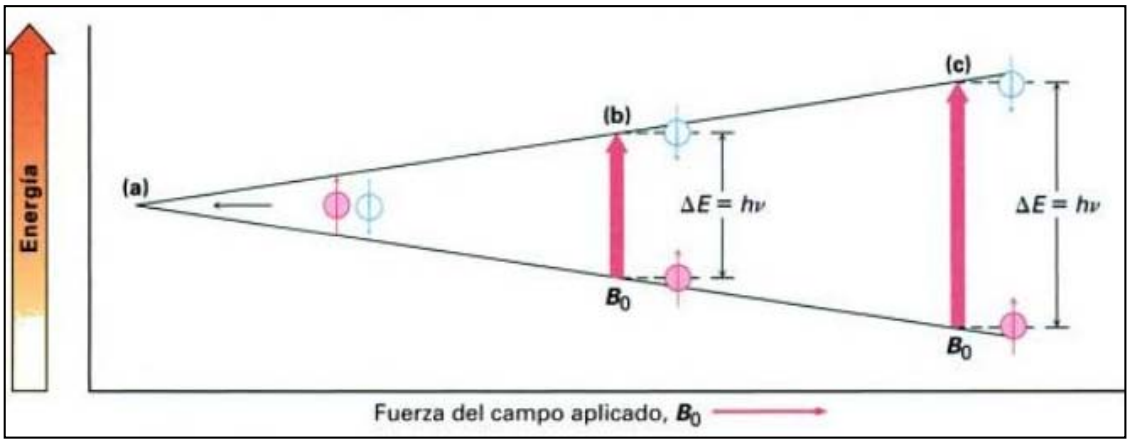
Si sometemos los núcleos a una radiación electromagnética de la frecuencia adecuada, hay una **absorción de energía** y el estado de menor energía, "*voltea su spin"* hacia el estado de mayor energía, cuando sucede el giro se dice que los núcleos magnéticos están en *resonancia con la radiación aplicada.*

Si se aplica un campo magnético muy intenso, la diferencia de energía entre los dos estados de spin es mayor y se requiere radiación de mayor frecuencia (mayor energía) para voltear el espín. Si se aplica un campo magnético más débil, se precisa menos energia.[16]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



ΔE = a la diferencia de energías entre los estados de spin. (a) Los estados de spin tienen energías iguales en ausencia de un acampo magnético aplicado, (b) energías diferentes en presencia de campo magnético, (c) ΔE entre los estados de spin es mayor cuando el campo aplicado es mas intenso.

2.4.2. Apantallamiento o Protección Magnética por los Electrones

La frecuencia de absorción no es igual, para todos los núcleos he 1H o de 13C. Todos los núcleos en las moléculas están rodeados por electrones. Cuando se aplica un campo magnético externo a una molécula, los electrones en movimiento alrededor del núcleo desarrollan por cuenta propia campos magnéticos, los cuales se oponen al campo magnético aplicado, de tal manera que el *campo magnético efectivo* que siente el núcleo es algo mas débil que el campo aplicado. Por tanto se dice que el núcleo está **protegido o apantallado.**[16].

$$B_{efectivo} = B_{aplicado} - B_{local}$$

Puesto que cada núcleo tiene un entorno electrónico ligeramente diferente, cada núcleo esta protegido en grado ligeramente diferente, y el *campo magnético efectivo* no el mismo para ninguno.es posible detectar las pequeñas diferencias entre los campos magnéticos efectivos, y por consiguiente veremos una señal distinta de RMN para cada núcleo 13C o 1H químicamente distinto en sus respectivas moléculas.[17]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.4.3. Desplazamiento Químico

Los desplazamientos químicos, se deben a los campos magnéticos secundarios producidos por la circulación de electrones en la molécula. [16] La posición en la gráfica en la que absorbe un núcleo es su desplazamiento químico. Los espectros de RMN se muestran en gráficas donde se ve que la intensidad del campo magnético aplicado, aumenta de izquierda a derecha. Por consiguiente la parte izquierda del grafico es el lado bajo, y la parte derecha, la del campo alto.[17] Es conveniente establecer la posición de los picos de absorción de resonancia con relación al pico de resonancia de una sustancia patrón interno que puede ser medida durante el experimento.[16]

El patrón interno que se utiliza depende del núcleo que se estudia y del disolvente, el compuesto más utilizado es el Tetrametilsilano (TMS), (CH3)4Si que proporciona un solo pico agudo a un campo aplicado intenso, bien separado de la mayoría de los picos de interés.[17] Las gráficas de RMN se calibran usando una escala arbitraria, llamada Escala Delta (δ) en la que 1 δ = 1ppm del frecuencia de operación del espectrómetro. Por ejemplo, si se estuviera midiendo el espectro RMN-1H, con un instrumento que opera a 200 MHz, 1 δ seria 1ppm de 200 millones de Hz.

Se usa la ecuación siguiente para cualquier absorción:

$$\delta = \frac{\sigma_{muestra} - \sigma_{referencia}}{\sigma_{referencia}} \times 10^6$$

Como el silicio es menos electronegativo que el carbono, los grupos metilo del TMS son relativamente ricos en electrones, es decir, sus protones están fuertemente apantallados. Como consecuencia de este apantallamiento, estos protones absorben a una intensidad de campo mayor que el resto de protones enlazados al carbono o a otros elementos, de manera que casi todas las señales de resonancia magnética nuclear aparecen a campos más bajos (hacia la izquierda de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

la señal del TMS). Además todos los protones del TMS absorben con el mismo desplazamiento químico dando una única absorción intensa. La absorción del tetrametilsilano (TMS) se define como 0.00δ. La mayor parte de los protones absorben a campos menores que el TMS, de modo que la escala δ aumenta hacia los campos menores. La mayoría de las señales de protones (1H) varían entre 0 y 12 δ , mientras que las señales del 13C varían del 0 a 250 δ .

2.4.4. Transformada de Fourier

En la Técnica de Transformada de Fourier RMN que se emplea en los espectrómetros modernos, se registran al mismo tiempo todas las señales. Se coloca una muestra en un campo magnético de intensidad constante y se irradia con un corto impulso de energía de radiofrecuencia.

Un espectro de FT-RMN, puede registrarse en 2 segundos utilizando menos 5mg de muestra.[16, 17]

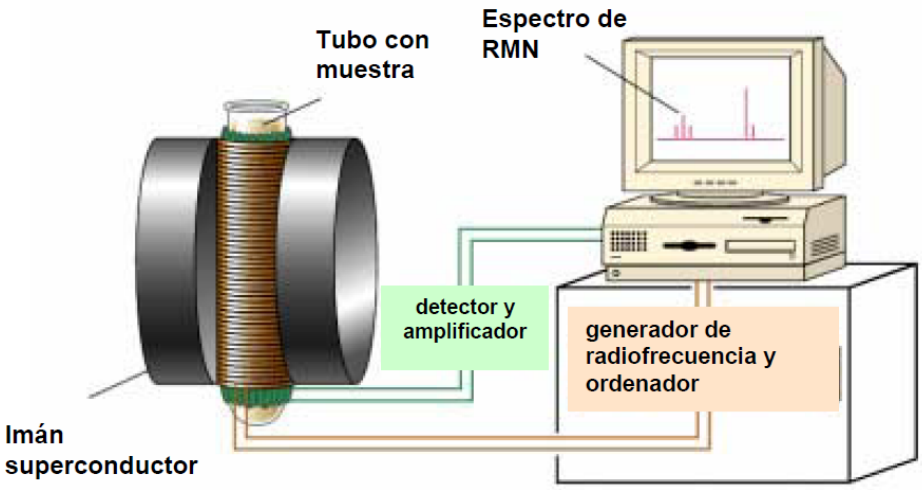


Figura 2.5.: Equipo de Resonancia Magnética Nuclear

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.5. AUTOOXIDACIÓN Y ANTIOXIDANTES

2.5.1. Radicales Libres

Radicales libres son átomos, moléculas o sus fragmentos, con uno o más electrones desapareados capaces de tener una existencia independiente por un corto periodo de tiempo. Pueden ser tanto neutrales como tener un carácter aniónico o catiónico.[18, 19]

Al poseer un electrón desapareado, son muy reactivos ya que tienden a robar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica.[20]

Esto causa la oxidación de las moléculas cuyo electrón fue robado, por lo que los radicales libres son llamados oxidantes.

Para ejercer este control, los sistemas protectores reducen la toxicidad de los metabolitos reactivos y radicales libres de la siguiente manera:[18]

- ✓ Mecanismos que previenen la formación de radicales libres.
- ✓ Sistemas que eliminan los radicales libres y metabolitos reactivos ya formados (antioxidantes).
- ✓ Sistemas de reparación que eliminan moléculas oxidadas dañadas.

2.5.2 Autooxidación en Productos Alimenticios

Las grasas, aceites y los alimentos con base lipidia se deterioran al sufrir diversas reacciones de degradación, tanto por calentamiento como durante su almacenamiento prolongado. Los principales procesos de deterioro son las reacciones de oxidación y descomposición de productos de oxidación que provocan una disminución del valor nutricional y de la calidad sensorial.[21]

La oxidación es la conversión química de un componente en otro que contenga menos electrones. En lo productos alimenticios, la reacción espontánea o auto

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

catalizada de una sustancia química con el oxigeno atmosférico es denominada autooxidación.[22]

La oxidación puede inhibirse por varios métodos que incluyen impedir el acceso al oxígenos, el uso de temperaturas mas bajas, la inactivación de las enzimas que catalizan la oxidación, la reducción de la presión de oxigeno y un empaquetado adecuado.[21] Otro método de protección contra la oxidación es el uso de aditivos específicos que inhiben la reacción.

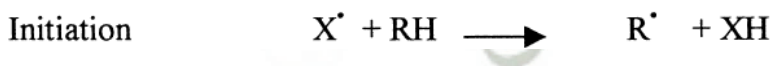
A. Mecanismo de Autooxidación

La autooxidación es la reacción directa del oxigeno molecular con compuestos orgánicos, bajo determinadas condiciones.

Es una reacción en cadena de radicales libres, que se desarrolla en tres pasos: iniciación, propagación y terminación.[21]

Iniciación: en la cual se forman radicales libres a partir de moléculas lipídicas. La sustracción de un átomo de hidrogeno por una especie reactiva, tal como un radical hidroxilo, provoca la iniciación de la oxidación lipídica.[21]

Las moléculas de oxígenos en estado singulete, oxidan directamente al grupo –CH del acido graso insaturado (RH), a la vez que desplaza el doble enlace y forma un radical alquilo (R*)



Propagación: consiste en la transformación de un radical lipídico en otro diferente.[21] Los radicales alquilo (R*) formados en el paso de iniciación, son reactivos con el oxígeno disponible, formando radicales peroxi (ROO*) a una velocidad alta.

El radical peroxi desaparece a una velocidad lenta formando un hidroperoxido (ROOH) y un nuevo radical libre, puede propagar la reacción en cadena.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Propagation

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + R'H \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

Terminación: en las cual los radicales libres se combinan para formar moléculas con electrones apareados son reacciones de baja energía, pero están limitadas por la baja concentración de radicales.[21]

La reacción en cadena de los radicales libres, termina en esta etapa, donde dos radicales libres se juntan.[23]

Termination

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2$$

$$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow RR$$

B. Inhibición de la Autooxidación

La cadena de autooxidación puede ser retardada por dos tipos de inhibidores: inhibidores de la reacción en cadena (o antioxidantes) e inhibidores preventivos.

Los antioxidantes atrapan los radicales libres, interrumpiendo el paso de la propagación. Formando un radical antioxidante de reactividad tan baja que impide la reacción con los lípidos. Ejemplo: polifenoles, aminas y quinonas.[21] Por otro lado, los inhibidores preventivos desactivan las especies activas y los posibles precursores de los radicales libres, reduciendo su velocidad de formación.

2.5.3. Antioxidantes

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

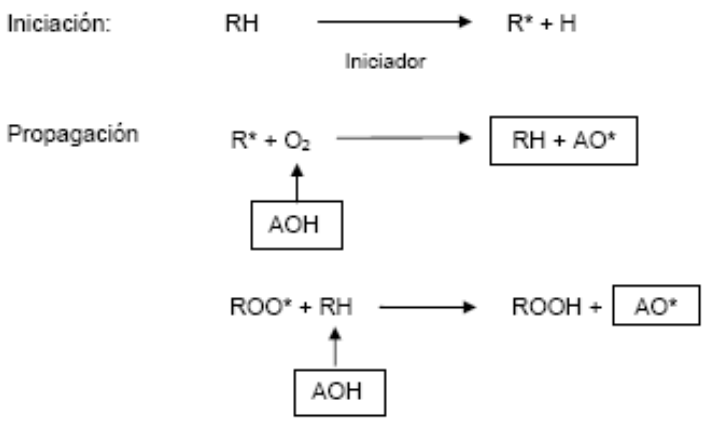
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Antioxidantes son compuestos que a bajas concentraciones previenen el daño oxidativo de moléculas, causado por oxidantes (radicales libres y metabolitos reactivos). Así mismo, los productos de la reacción entre oxidante y antioxidante no deben ser tóxicos y no deben desencadenar una reacción en cadena de radicales.[18, 24]

Un buen antioxidante es el que genera compuestos que tienen una baja influencia para promover procesos oxidativos.

Los antioxidantes pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón a los radicales formados en los ácidos grasos insaturados, formando productos más estables.[25] Desde el punto de vista práctico, los antioxidantes tienen que poseer las siguientes propiedades:

- Ser efectivos a bajas concentraciones (0.001-0.02%).
- No mostrara desarrollo de sabor, olor, color cuando son adicionados.
- Ser compatibles con el alimento y ser de fácil aplicación.
- Tener estabilidad bajo las condiciones del proceso y/o el almacenamiento del alimento.



2.5.4 Tipos de Antioxidantes

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Primarios: Son compuestos que neutralizan a los radicales libres. Los principales compuestos de estos grupos son; butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), ter-butilhidroxiquinona (TBHQ). También podría incluirse dentro de este grupo los compuestos de origen vegetal o animal, que pueden ser clasificados como antioxidantes primarios y/o sinergistas.[26]

Atrapadores de Oxígeno: Son compuestos que remueven el oxígeno de los sistemas cerrados. El acido ascórbico y sus derivados son los mejores ejemplos de este grupo, los cuales actúan como sinergistas en la regeneración de los antioxidantes primarios.[26]

Enzimáticos: incluyen varias enzimas como la glucosa oxidasa, la superóxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidadsa. Estos remueven el oxigeno de los compuestos altamente reactivo. [26]

Agentes Quelantes: Son compuestos secuestrantes de iones de compuestos metálicos (cobre, hierro) que catalizan la oxidación lipídica. El ácido etilendiaminotetracético (EDTA), el ácido cítrico, los compuestos fenolitos de las plantas, y los aminoácidos. También estos compuestos son clasificados como sinergistas.[26]

2.5.5. Antioxidantes Sintéticos

Son definidos por la Administración de Alimentos y Medicinas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en ingles) como conservadores alimenticios que retardan específicamente el deterioro, rancidez, o decoloración, debidos a la oxidación lipídica.

Los más populares son los que derivan de las estructuras fenólicas o los que tengan un grupo fenolito dentro de la configuración de su estructura molecular.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Entre los fenolitos mas frecuentemente usados como antioxidantes son: 2,6-ter-butil-4-metilfenol (BHT), el tre-butil-4-hidroxianiasol (BHA), ter-butil-hidroxiquinona (TBHQ), y 6-etoxi-1,2- dihidro-2,4-trimetilquinolona (ethoxyquin, EQ). [27]

En general la concentración total de antioxidantes sintéticos autorizados para ser adicionados solos o en combinación no debe exceder del 0.02% por peso de grasa en el alimento.

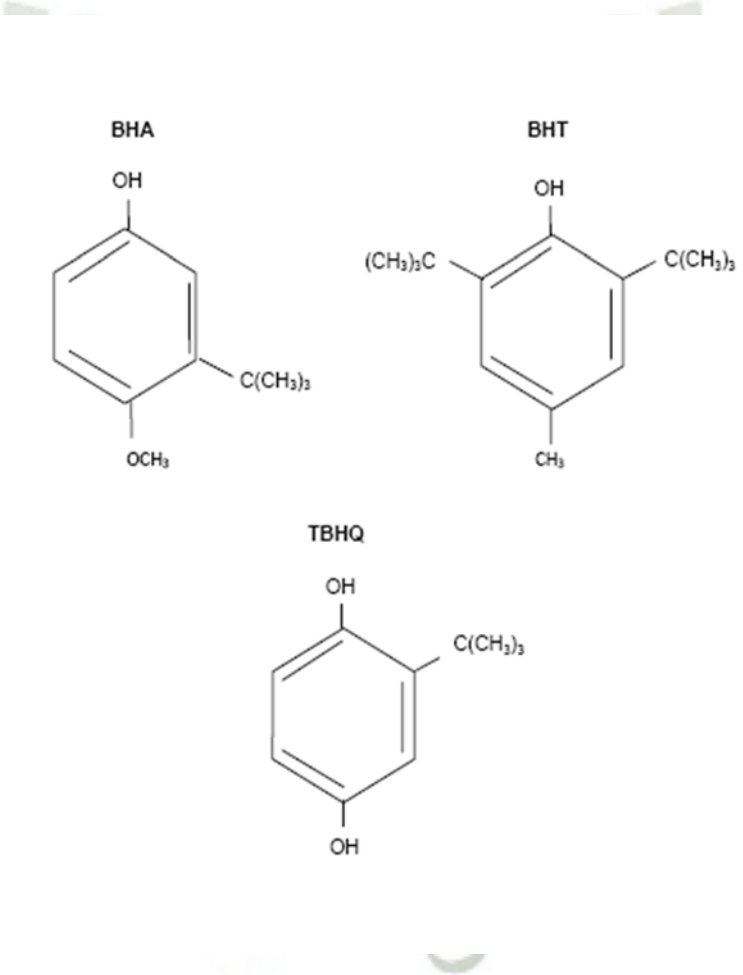


Figura 2.6: Antioxidantes Sintéticos

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.6. Técnicas Cromatográficas

La cromatografía es un proceso de separación en el cual la muestra se distribuye en dos fases: una estacionaria, mientras que la otra es móvil y pasa a través del lecho cromatográfico. La fase estacionaria puede ser un material sólido, poroso, de superficie activa a manera de pequeñas partículas, o una película delgada de líquido que cubre un soporte sólido o una columna. La fase móvil es gaseosa o líquida. Por lo tanto, si la fase móvil es gaseosa se denomina cromatografía gaseosa. Mientras que en la cromatografía líquida, la fase móvil es siempre líquida.[28] De este modo, al pasar la fase móvil sobre una fase estacionaria, una mezcla de sustancias puede ser separada en sus componentes.[29]

Dentro de la cromatografía líquida, la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) son las más comunes.

2.6.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Es una forma de cromatografía líquida en la cual la fase móvil es un líquido y fase la estacionaria está situada a manera de una capa fina sobre una superficie plana.[30, 29]. La fase móvil migra a través de la fase estacionaria por acción de fuerza capilares (aunque también puede hacerlo por fuerzas de gravedad o presión) y es el medio de transporte para que los solutos sean separados. La sílica gel es el adsorbente más utilizado en las fases estacionarias.[30]

El movimiento de las sustancias en TLC es el resultados dos fuerzas opuestas: la fuerza de conducción de la fase móvil y la acción de resistencia o retención del adsorbente. La fuerza de conducción tiende a mover las sustancias desde el origen, en dirección del flujo de la fase móvil. La acción de resistencia impide el movimiento de las sustancias al arrastrarlas de la fase móvil al adsorbente. Así, la distancia recorrida por el centro de cada zona de soluto en un tiempo dado es el resultado estas fuerzas de conducción y resistencia.[30]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Las sustancias que se mueven lentamente son atraídas con mayor fuerza a la capa adsorbente. Mientras que aquellas que se mueven rápido pasan una fracción menor de su tiempo en la capa debido a una menor afinidad por ella y a una mayor solubilidad en la fase móvil. La capacidad de lograr una migración diferencial (resolución o separación) entre los componentes de una mezcla es el resultado de la selectividad, eficiencia y capacidad del sistema cromatográfico (capa, fase móvil y solutos). Es decir, una migración diferencial a lo largo de la capa, se debe a que los solutos pasan diferentes cantidades de tiempo en el adsorbente, lo cual está determinado por las interacciones del sistema cromatográfico.[30]

Después del desarrollo de la corrida cromatográfica, la capa es removida de la cámara donde se realizó la cromatografía y los solventes de la fase móvil son evaporados a medio ambiente o en un horno. Las sustancias coloreadas pueden ser vistas a la luz del día, sin tratamiento previo. Sustancias no coloreadas se pueden detectar si los compuestos absorben en la región del UV corto (254 nm) o si pueden excitarse para producir fluorescencia por radiación de onda corta o larga (366 nm). También la detección puede llevarse a cabo por medio de reactivos cromogénicos (produciendo manchas coloreadas), o reactivos fluorogénicos (produciendo manchas fluorescentes) o por métodos biológicos.[30]

La posición de la zona de una sustancia (mancha) puede ser descrita con la ayuda del Factor de Retención (Rf), que es el cociente obtenido al dividir la distancia entre la zona de la sustancia y la línea base, por la distancia entre el recorrido del solvente y la línea base. Esto describe la posición de una mancha en el cromatograma de un modo numérico simple. El Rf es siempre menor o igual a 1.[29]

Es importante mencionar que la saturación de la cámara tiene gran influencia en los valores de Rf y en la separación lograda. En el desarrollo en una cámara insaturada, el solvente se evapora de la placa, se requiere de más solvente para una causar una migración y el valor de Rf aumenta. En cambio, en una cámara pre-saturada con vapores de la fase móvil, la placa se carga con los vapores y se requiere de menos solvente para causar la misma migración, por lo que los valores de Rf serán menores.[30, 29]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

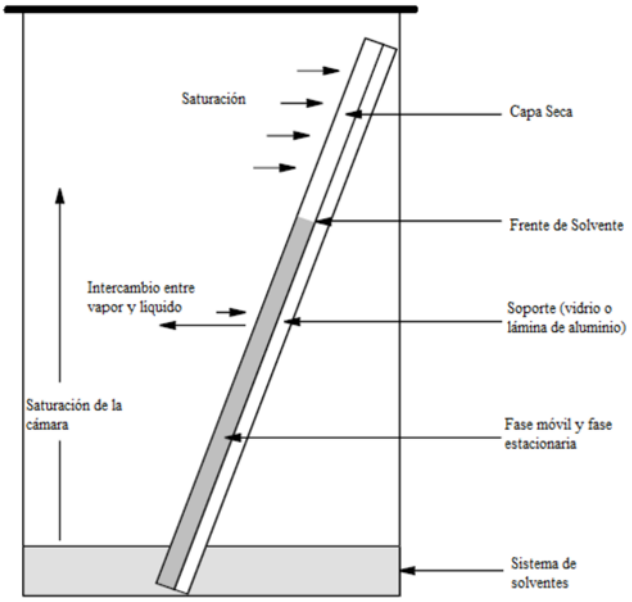


Figura 2.7: Cromatografía en Capa Fina

El tipo de TLC que se usa con mayor frecuencia es el de tipo normal o directo. En TLC de fase normal, la capa (de sílica o alúmina) es más polar que la fase móvil, y los solutos polares se unen con más fuerza cerca del origen. Por lo tanto las sustancias polares requerirán de un solvente polar para causar una migración en la capa adsorbente de sílica, y la fuerza de elución aumenta con la polaridad de un solvente. Por otro lado, en TLC de tipo reverso, la capa es menos polar que la fase móvil, los solutos no-polares son retenidos con mayor fuerza, y los solventes menos polares son los eluyentes más fuertes.[30]

2.6.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):

Las siglas HPLC hacen referencia a la cromatografía líquida de alta resolución o "*high performance liquid chromatography*".[31] Es un método cromatográfico poderoso que permite excelentes separaciones de mezclas complejas en periodos de tiempo cortos.[28]

A. Principios Generales:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

En este tipo de cromatografía, la muestra pasa a través de una fase estacionaria empaquetada en una columna, llevada por una fase móvil líquida a elevada presión. Durante ese tiempo los componentes de la muestra son separados en la columna.[31] Después de la separación los analitos son reconocidos por un detector a medida que eluyen de la columna.[31] Se pueden analizar trazas de materiales orgánicos e inorgánicos en concentraciones de 10-6 a 10-12 g dependiendo del detector elegido.[31, 32]

En HPLC, la fase estacionaria y la fase móvil son capaces de interactuar con la muestra de forma selectiva.[32] Tradicionalmente, las columnas de HPLC eran polares (como la sílica), y las fases móviles usadas eran relativamente no polares, esta forma de HPLC es llamada de fase normal.[31]

Sin embargo, hoy en día la forma más común de HPLC es la de fase reversa.

Aquí las columnas son hidrofóbicas y la fase móvil está constituida por combinaciones miscibles de agua y modificadores orgánicos (los más comunes son metanol y acetonitrilo). Por lo tanto, en este tipo de HPLC los analitos hidrofóbicos son los más retenidos, y son eluídos con mayor facilidad a medida que la proporción del componente hidrofóbico de la fase móvil aumenta.[31, 28] La separación depende de la interacción hidrofóbica entre la molécula de soluto en la fase móvil y la fase estacionaria.[33]

B. Instrumento:

El equipo de HPLC tiene los siguientes componentes: [34, 35,36]

- ✓ **Reservorio de Solvente:** El cual alimenta al sistema con la fase móvil.
- ✓ **Bomba**: Fuerza el pasaje de la muestra y de la fase móvil a través de la columna, impulsando la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hasta la columna.
- ✓ **Inyector:** Permite la introducción de la muestra, sin interrumpir el flujo del solvente a través del sistema.
- ✓ **Columna analítica**: Es el lugar donde se produce la separación, es el corazón del sistema cromatográfico. Las columnas analíticas eficientes

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

deben tener una fase estacionaria homogénea y de tamaño de partícula pequeño.

Guarda columnas preceden a veces a las columnas analíticas para protegerlas del polvo e impurezas que pueden dañar la columna. Las separaciones en HPLC son sensibles a cambios de temperatura, por lo que hornos para columnas son a veces empleados para controlar la temperatura de la separación.

- ✓ **Detector:** Sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna, debe ser capaz de reconocer una sustancia cuando eluye de la columna, convertir esto en una señal eléctrica y transmitirla al *display*, donde es mostrada como una desviación de la línea base.
- ✓ **Sistema de registro:** El registro de los datos provenientes del detector y su eventual manipulación se obtienen a partir de un sistema de toma y procesamiento de datos, constituido por un registrador gráfico, integrador y computadora.

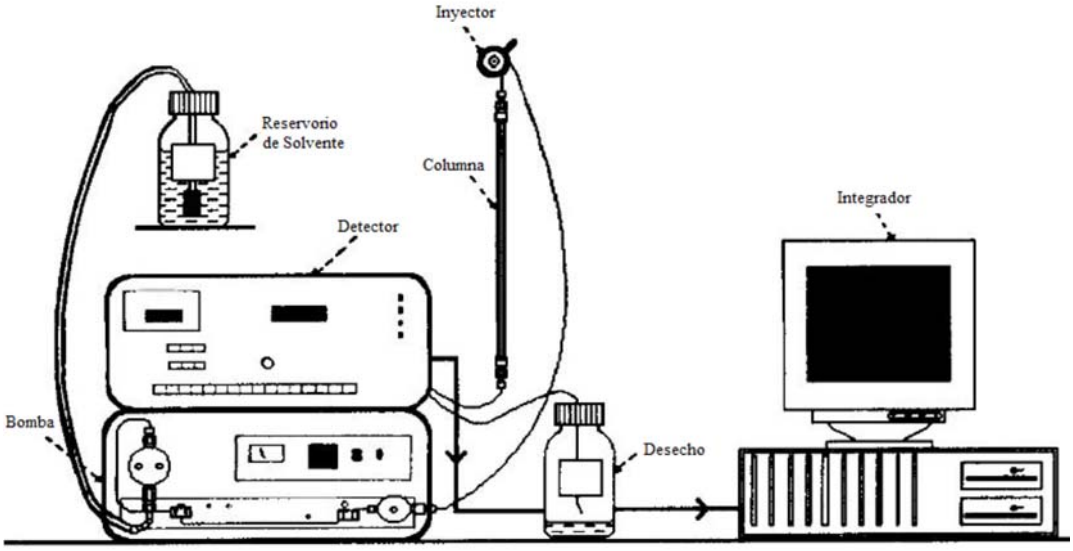


Figura 2.8: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

HPLC pude usarse como una técnica cualitativa o cuantitativa. Información cualitativa puede permitir identificar una sustancia basándose en la comparación del tiempo de retención entre un estándar y la muestra. Cuando se usa de forma cuantitativa, HPLC puede usar un estándar externo o interno para generar una curva. Luego, el área del pico de la muestra en el cromatograma puede usarse para obtener una concentración.[31]

2.7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación es, sin dudas, un requerimiento básico para asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados para todas las aplicaciones analíticas. La validación no debe ser mirada como una actividad singular, siempre debe ser comprendida con respecto al ciclo de vida del procedimiento analítico. Empezando con el desarrollo del método u optimización, el desempeño del procedimiento analítico debe encajar con los requerimientos en un proceso interactivo.[37]

2.7.1. ¿Qué es Validación de un Método?

"La validación de métodos es el proceso de demostrar que los procedimientos analíticos son apropiados para su propósito. El proceso de validación de un método empieza con la colección planeada y sistemática de datos para dar soporte a los procedimientos analíticos", establece la FDA en su más reciente publicación: "Guía para la Industria en Procedimientos Analíticos y Validación de Métodos".[38]

Así mismo la FDA sostiene que, establecer evidencia documentada otorga un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá un producto que encaje en sus especificaciones predeterminadas y en sus atributos de calidad; según la publicación "Principios Generales de Validación" de 1987.[39]

La definición ISO de validación es la confirmación por examinación y provisión de evidencia objetiva que los requerimientos particulares para un uso específico, son cumplidos.[40]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

A partir de esto, se puede interpretar la validación de un método como el proceso de definir el requerimiento analítico, y confirmar que el método bajo consideración tiene capacidades de performance consistentes con lo que la aplicación requiere. Está implícito que será necesario evaluar las capacidades de desempeño del método y que los estudios para determinarlas son llevados a cabo usando equipamiento que se encuentra trabajando correctamente.

Asimismo, el operador que lleva a cabo la validación debe ser competente en el campo de trabajo bajo estudio y poseer suficiente conocimiento para ser capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas a medida que el estudio progresa.[40] Los resultados de la validación de un método pueden ser usados para juzgar la calidad, confiabilidad y consistencia de resultados analíticos; es una parte integral de cualquier buena práctica analítica.[39]

2.7.2. ¿Por qué es necesaria la Validación de un Método?

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que éste es adecuado para su propósito, determinado por estudios experimentales bien documentados.[37]

Millones de mediciones analíticas se llevan a cabo a diario en miles de laboratorios alrededor del mundo. El costo de llevar a cabo estas mediciones es alto, y costos adicionales surgen de las decisiones tomadas en base a estos resultados. Es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrarlo. Cuando un "cliente" comisiona un trabajo analítico a un laboratorio, se asume que el laboratorio tiene un grado de conocimiento avanzado que el cliente no posee. El cliente espera poder confiar en los resultados reportados. Por lo tanto, el laboratorio y su equipo de trabajo tienen una clara responsabilidad de justificar la confianza del cliente otorgándole la respuesta correcta para la parte analítica del problema. Está sobreentendido que, las pruebas llevadas a cabo son apropiadas para la parte analítica del problema que el cliente quiere resolver, y que el reporte final presenta los datos analíticos de manera que el cliente pueda comprender y sacar sus propias conclusiones. De este modo, el desempeño del método debe ser adecuadamente validado.[40]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.7.3. ¿Cuándo se debe Validar los Métodos? [37,40]

Un método debe ser validado o revalidado cuando es necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso para un problema analítico particular. Por ejemplo:

- ✓ Un nuevo método desarrollado para un problema en particular, antes de su introducción para uso de rutina.
- ✓ Métodos establecidos a los que se les incorpora mejoramientos o se los extiende para un nuevo problema.
- ✓ Cuando alguna de las condiciones cambia para un método ya validado (por ejemplo: un instrumento con características diferentes, o muestras con diferente matriz).
- ✓ Cuando el control de calidad indica que un método establecido cambia con el tiempo.
- ✓ Cuando un método establecido es usado en un laboratorio diferente, o con diferentes analistas o diferentes instrumentos.
- ✓ Cuando se desea demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo un nuevo método y uno estándar.

La extensión de la validación o re-validación que se requiera, dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar el método en diferentes laboratorios, instrumentos, operadores y las circunstancias en las cuales el método será usado. Algún grado de validación es siempre apropiado incluso cuando se usa métodos estándar aparentemente bien caracterizados o métodos publicados.

2.7.4. Estrategia para la Validación de Métodos: [39]

La validad de un método específico debe ser demostrada en experimentos de laboratorio usando muestras o estándares que son similares a las muestras desconocidas analizadas rutinariamente. La preparación y ejecución debe seguir un protocolo de validación, de preferencia, escrito en un formato instructivo paso

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

a paso. Posibles pasos para una completa validación de un método son los siguientes:

- ✓ Desarrollar un protocolo de Validación, un procedimiento operacional, o un plan máster de validación (VMP).
- ✓ Para un proyecto específico de validación, definir los responsables y sus tareas.
- ✓ Desarrollar un plan del proyecto de validación.
- ✓ Definir la aplicación, objetivo y alcance del método.
- ✓ Definir los parámetros de desempeño y criterios de aceptación.
- ✓ Definir los experimentos de validación.
- ✓ Verificar las características de desempeño relevantes de los equipos.
- ✓ Calificar a los materiales: estándares y reactivos de pureza, cantidad apropiada, suficiente estabilidad.
- ✓ Realizas experimentos de pre-validación.
- ✓ Ajustar parámetros del método y/o criterios de aceptación si fuese necesario.
- ✓ Desarrollar todos los experimentos de validación.
- ✓ Desarrollar los procedimientos operacionales estándar para poder ejecutar el método de forma rutinaria.
- ✓ Definir los criterios para re-validación.
- ✓ Definir los tipos y frecuencia de las pruebas de idoneidad del sistema, y/o controles de calidad analítica de rutina.
- ✓ Documentar los experimentos de la validación y los resultados en un reporte de validación.

Las características de desempeño del método deben ser basadas en el uso que se le dará a dicho método. No siempre es necesario validar todos los parámetros analíticos que están disponibles para técnicas específicas. Los parámetros iniciales deben ser escogidos de acuerdo a la experiencia del analista y a un buen raciocinio. Los parámetros finales deben concordar entre el laboratorio o el analista que realiza la validación y el laboratorio o individuo que use el método, o la información que se genere del método. En la siguiente Tabla se indican los parámetros que pueden ser evaluados para distintas pruebas analíticas:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABAL 2.2: Parámetros a Evaluar en Pruebas Analíticas

	Componentes Principales	Componentes Principales y Trazas	Trazas	
	Cuantitativo	*Cuantitativo*	*Cualitativo*	*Cuantitativo*
Límite de Detección	No	No	Sí	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	Sí
Linealidad	Sí	Sí	No	Sí
Rango	Sí	Sí	No	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí
Exactitud	Sí	Sí	No	Sí
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Sí
Robustez	Sí	Sí	No	Sí

2.7.5. Metodología para la Validación de un Método Analítico

A. Selectividad:

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar el analito de interés de forma inequívoca, en la presencia de componentes que se puede suponer que están presentes. Típicamente, estos pueden incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.[37, 38, 41, 42,43]

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como: [41]

- ✓ Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- ✓ Distorsionar la respuesta del analito (afectan normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionas con él de una u otra forma.[41]

Determinación:

- *Discriminación de analitos cuando las impurezas están disponibles:* Debe envolver la demostración de la discriminación del analito en la presencia de impurezas y/o excipientes. Esto puede ser hecho por adición de apropiados niveles de impurezas y/o excipientes a las sustancias puras (sustancias activas o productos). Demostrando que el ensayo no resulta afectado por la presencia de estos materiales (comparando con el resultado obtenido de muestras que no fueron añadidas).[42]

- *Discriminación del analito cuando las impurezas no están disponibles:* Si las impurezas o estándares de productos de degradación no están disponibles, se realiza una degradación artificial, por ejemplo:[34,42]

  - *Termólisis:* producida por calentamiento del analito a la temperatura fijada.
  - *Hidrólisis:* calentamiento con agua durante 1 hora.
  - *Hidrólisis alcalina:* calentamiento con NaOH 0.1N durante 1 hora.
  - *Hidrólisis ácida:* calentamiento con HCl 0.1N durante 1 hora.
  - *Fotólisis:* exposición del analito a la luz UV
  - *Oxidación:* calentamiento en baño María de una solución del analito con gotas de peróxido de hidrógeno (5%) o por burbujeo de oxígeno.

Este análisis debe complementarse con el estudio de la pureza u homogeneidad del pico correspondiente al analito. Este estudio consiste en determinar si existe algún producto de descomposición que produzca un pico superpuesto al del analito y que no alcance a evidenciarse.[34]

B. Linealidad y Rango:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad (dentro de un rango determinado) de obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.[37,38,39,40,41,42,43]

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración superior e inferior (cantidades) de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para el cual se ha demostrado que el procedimiento analítico posee un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.[38, 39, 41, 42, 43,44]

Determinación

La linealidad debe ser evaluada por inspección visual de un ploteo de señales en función de la concentración o contenido de analito. Si hay una correlación lineal, los resultados del test deberán ser evaluados por métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados. En algunos casos, para obtener linealidad entre los ensayos y las concentraciones de las muestras, los datos pueden necesitar de una transformación matemática, antes del análisis de regresión.[42, 43]

El coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales, deben ser presentados. Se debe incluir un ploteo de los datos. Adicionalmente, un análisis de la desviación de los puntos de la regresión puede ser de ayuda para evaluar la linealidad. [42,43]

Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado, con un total de 15 determinaciones.[41]

C. Exactitud:

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como verdadero o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado. [37, 38, 39,40, 41, 42, 43,44]

También, la exactitud de un método es conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el verdadero.[34]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿Cuál es el valor verdadero del analito en la muestra? Desafortunadamente, el valor verdadero en muchos casos se desconoce. No obstante, cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero.[41]

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra (más o menos complejo) y de la concentración del analito en la misma.[41]

Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación de analito cercanos al 100%, en ciertos tipos de muestras con matrices complejas (productos naturales, fluidos biológicos, alimentación, etc.) sólo se obtienen valores del 50, 80, 90%.[41]
Debido a los diferentes grados de dificultad que presenta la recuperación de analito, en función de la naturaleza de la matriz y del propio analito a extraer, al estudiar la exactitud como porcentaje de recuperación de analito en plantas medicinales (materia prima, preparados como extractos, infusiones, especialidades farmacéuticas elaboradas con plantas medicinales o preparados de éstas) debe considerarse límites de aceptación mucho más amplios que los acordados para el porcentaje de recuperación de analito en una especialidad farmacéutica con principios activos puros.[41]

Determinación

La exactitud debe determinarse a lo largo del rango especificado para el procedimiento analítico.29
Existen varios métodos para determinar la exactitud: [42,44]

- ✓ Aplicación del procedimiento analítico a sustancias sintéticas de los componentes de la muestra, a las cuales se han añadido cantidades conocidas del analito.
- ✓ En casos donde es imposible obtener muestras de todos los componentes del producto, se puede añadir cantidades conocidas del analito al producto, o comparar los resultados obtenidos con un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud ha sido definida y/o establecida.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- ✓ La exactitud puede ser deducida, una vez que la precisión, linealidad y especificidad han sido establecidas.

Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo 3 determinaciones por 3 niveles de concentración, que podrían ser la concentración central y las concentraciones de los extremos (superior e inferior) del rango de trabajo.[39,41,42]

La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida a la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza. [39, 41,42]

D. Precisión:

La precisión de un procedimiento analítico expresa la proximidad (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.[37, 40, 41, 42, 43,44] La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central.[34]

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios, inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobe los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.[41]

La precisión puede ser considerada a 3 niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.[37, 39,42]

- ✓ *Repetibilidad:* Expresa la precisión bajo las mismas condiciones operacionales a lo largo de un intervalo corto de tiempo.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- ✓ *Precisión Intermedia:* Expresa las variaciones dentro del laboratorio: días diferentes, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.
- ✓ *Reproducibilidad:* Expresa la precisión entre laboratorios (estudios de colaboración usualmente aplicados para la estandarización de la metodología).

Determinación

La precisión, bajo la forma de repetibilidad, se puede calcular de las siguientes maneras [34, 41,42]

- ✓ *Repetibilidad del Sistema Instrumental:* Estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente el mismo estándar de forma consecutiva de 6 a 10 veces.
- ✓ *Repetibilidad del Método:* Evalúa la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la lectura de resultados. Se proponen dos alternativas:
  - Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.
  - Un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

La precisión de un procedimiento analítico es expresada usualmente como varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de mediciones.29 El %RSD del no debe ser mayor a 2%.[38]

E. Límite de Detección y Límite de Cuantificación:

El límite de detección de un procedimiento analítico es la menor cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto.[37, 38, 39, 40, 41, 42,43]

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico, es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinado de manera cuantitativa con una adecuada precisión y exactitud. [37, 38, 39, 40, 41, 42,43]

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es sólo cualitativo, encontrándose entre ambos términos un

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, sí puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.[41]

Determinación:

- ✓ *Basada en la evaluación visual:* La evaluación visual puede ser usada para métodos no-instrumentales, pero también con métodos instrumentales. El límite de detección y cuantificación es determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito y estableciendo el nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado y cuantificado de manera confiable, respectivamente.[41,42]

- ✓ *Basada en la relación señal-ruido:* Este método sólo puede ser aplicado para procedimientos que proporcionan una señal blanco, un ruido de fondo o una línea base, es decir una señal residual a concentración cero de analito. La determinación de la señal del ruido se realiza comparando señales medidas de muestras con concentraciones bajas conocidas del analito, y con aquellas de las muestras blanco, estableciendo la mínima concentración a la cual el analito puede ser detectado y cuantificado de manera confiable. Una relación de señal y ruido entre 3 o 2:1 es generalmente considerada aceptable para la estimación del límite de detección y una relación señal ruido entre 10:1 es considerada aceptable para la estimación del límite de cuantificación.[41,42]

- ✓ *Basada en la Desviación Estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado:* Se pueden calcular los límites de detección y cuantificación de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo y la pendiente de la recta de calibrado del analito.[41]

- ✓ *Basada en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero:* Este método utiliza la pendiente de una recta de calibrado realizada a

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

niveles de concentración cercanos a los límites esperados, pero sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultante de la extrapolación de dicha recta. La intersección con el eje "Y" corresponderá teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero de analito.

De la misma manera, se sustituye en la fórmula, la desviación estándar del blanco por la obtenida de estimar a partir de esta recta la de un hipotético blanco.[41]

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Campo de Investigación

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.1.1. Unidades de Estudio

Para realizar el presente trabajo de investigación se utilizaron distintas muestras de harina de pescado, las cuales fueron adquiridas en la Procesadora de Alimentos Marinos S.A. (PROMASA) de la ciudad de Ilo – Perú.

3.1.2. Ámbito Geográfico y Temporalidad

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Control de Calidad ubicado en el pabellón H-204, y en Laboratorio de Química Orgánica ubicado en el pabellón F-303 de las instalaciones de la UCSM de la ciudad de Arequipa-Perú.

El análisis de resonancia magnética nuclear que se realizó al estándar de etoxiquina, fue realizado en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear- Sección Química - Departamento de Ciencias, Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP).

3.2. Materiales

3.2.1. Materiales de Laboratorio

- Fiolas de 10 y 1000 ml
- Fiolas ámbar de 25 y 50 ml
- Micropipeta automática 10-1000 µl.
- Pipetas volumétricas de 1 y10 ml.
- Vasos de Precipitado 500 y 1000 ml.
- Cuba Cromatográfica
- Filtro de Membrana Nylon 0.45µm, 47 mm.
- Filtro Millipore Millex – PVDF 0.45 µm
- Matraz Kitasato 250 ml.
- Embudo de microfiltración 300 ml.
- Frascos de vidrio ámbar.
- Placas de sílica gel.
- Capilares.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Jeringas de 10ml

3.2.2. Reactivos

- Metanol grado HPLC (Merck)
- Acetonitrilo grado HPLC (Merck)
- Agua Ultrapura
- Acetato de Etilo
- Hexano
- Metanol Grado Reactivo
- Etanol
- Fosfato Monobásico de Sodio (Merck)
- Fosfato Dibásico de Sodio (Merck)
- Agua Destilada

- ***Estándar de Referencia***
  Ethoxyquin ≥ 75 %(SIGMA); $C_{14}H_{19}NO$.
  Densidad: 1.03 g/ml - Peso Molecular: 217.31 g/mol

3.2.3. Equipos:

- pHmetro (Metrohm) Modelo: 827 pHLab
- Balanza Analítica (Ohaus) Modelo: PA214
- Bomba de Vacío (Cole-Parmer) Modelo: 7049-02

- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance – HPLC (Merck Elite Lachrom), con los siguientes módulos:
- Organizador (Modelo: L – 2000; Serie: 17E16 – 034)
- Detector Arreglo Diodos (Modelo: L – 2450; Serie: 1726 – 011)
- Bomba (Modelo: L – 2130; Serie: 17E01 – 036)
- Software: EZChrom Elite

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

3.3 Métodos

3.3.1. Evaluación del Estándar de Etoxiquina



En análisis de productos se debe de tener estándares o materiales de referencia que permitan la validación de métodos analíticos y de allí que el método validado pueda utilizarse en analizar la materia prima o el producto deseado.

La Etoxiquina es un agente antioxidante que retarda la destrucción oxidativa de carotenos, xantofilas y vitaminas A y E. Con el fin de cumplir su objetivo puede descomponerse y esto es bastante común en este tipo de sustancias antioxidantes.

Adicionalmente, la etoxiquina en estado puro, debido a sus características, se va descomponiendo y comienza a tener una coloración parda. Por lo tanto, es muy difícil de conseguir la etoxiquina en purezas superiores al 99% que permitan llevar adecuadamente un análisis químico.

La etoxiquina utilizada en el presente trabajo de investigación presentaba un porcentaje de pureza de 75% y tenía una consistencia viscosa, de color pardo oscura lo que sugería la presencia de agentes contaminantes externos (figura 3.1).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Figura 3.1: Etoxiquina de color pardo oscuro, antes del Proceso de Destilación

Se efectuó un análisis por cromatografía en capa fina, previo a la Destilación al Vacío, el cual nos permitirá apreciar de mejor manera los posibles interferentes que se encuentran en nuestro estándar de Etoxiquina.

a) Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Preparación de la Fase Móvil [44]

En una cuba Cromatográfica, se colocó una fase móvil de Hexano: Acetato de Etilo (48:3), para la cantidad final de 10ml. Se bañaron las paredes de la Cuba Cromatografía con la fase móvil, se agito y tapo herméticamente. Dejar saturar el ambiente con la fase móvil por unos 30 minutos aproximadamente.

Corrida Cromatográfica

En una placa de sílica gel de 10cm de largo x 3.5cm de ancho, se traza delicadamente dos márgenes: superior, cada uno a 1 cm del borde de la placa. Sembrar el estándar de Etoxiquina y la muestra, diluidos en etanol, a la altura del margen inferior trazado en la placa.

Colocar la placa dentro de la Cuba Cromatográfica, tapar herméticamente y esperar a que la fase móvil ascienda hasta el margen superior trazado en la placa de silica.
Dejar secar la placa a temperatura ambiente.

Detección

Una vez seca la placa de silica gel, se podrá confirmar la existencia de interferentes en nuestro estándar de etoxiquina.

3.3.2. Obtención del Estándar Purificado

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

a) Método: Destilación al Vacío

Procedimiento Experimental

- Ensamblar el equipo, comprobar el giro de todas las piezas, engrasar el esmerilado en todas las uniones.

- Colocar el refrigerante y conectar la fuente de vacío al aparato de Destilación. El sistema de vacío cuenta con una trampa Dewar, que contiene una mezcla de hielo seco con etanol, la cual genera un descenso inmediato de la temperatura y por lo tanto un mejor sistema refrigerante.Se coloca el equipo en un baño de aceite, para suministrar calor al sistema, controlando la temperatura.

- Graduar el aporte de calor, para conseguir una lectura correcta del punto de ebullición.



Figura 3.2: Equipo de Destilación al Vacío

- Colocar en el matraz de Destilación 50ml (aprox.) del estándar de etoxiquina. Calentar gradualmente hasta que la mezcla de matraz de destilación comience a hervir. Se observara que el vapor asciende y condensa (refluye) en la cabeza de destilación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Cuando los vapores de destilado llegan al bulbo del termómetro, la temperatura comienza a ascender. El vapor comenzara a introducirse en la tubuladura lateral de la cabeza de destilación y en el refrigerante, y líquido condensara resbalando en el matraz colector.

- El aumento de temperatura en el termómetro continúa a la vez que empieza a recogerse las primeras notas de destilado hasta que llega un momento en que esta se estabiliza.

- Cuando la temperatura se mantenga estable, cambiar de matraz colector, el primero de ellos contendrá el líquido destilado junto con impurezas más volátiles.

- Observar la temperatura, cuando el líquido se agota, la temperatura desciende, ya que no hay suficiente vapor que llegue al bulbo del termómetro. Apagar la calefacción y dejar enfriar el equipo.

Se volvió a realizar una Cromatografía de Capa Fina al estándar de Etoxiquina luego de la Destilación al Vacío, para apreciar la nueva condición del mismo.

b) Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Preparación de la Fase Móvil [44]

En una cuba Cromatográfica, se colocó una fase móvil de Hexano: Acetato de Etilo (48:3), para la cantidad final de 10ml.

Se bañaron las paredes de la Cuba Cromatografía con la fase móvil, se agito y tapo herméticamente. Dejar saturar el ambiente con la fase móvil por unos 30 minutos aproximadamente.

Corrida Cromatográfica

En una placa de sílica gel de 10cm de largo x 3.5cm de ancho, se traza delicadamente dos márgenes: superior, cada uno a 1 cm del borde de la placa.

Sembrar el estándar de Etoxiquina y la muestra, diluidos en etanol, a la altura del margen inferior trazado en la placa.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Colocar la placa dentro de la Cuba Cromatográfica, tapar herméticamente y esperar a que la fase móvil ascienda hasta el margen superior trazado en la placa de silica. Dejar secar la placa a temperatura ambiente.

Detección

Se puede apreciar que la segunda placa, existe la presencia solo de nuestro estándar de etoxiquina.

3.3.3. Determinación Indirecta del Porcentaje de Pureza de la Etoxiquina

a) Método: Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (^{1}H)

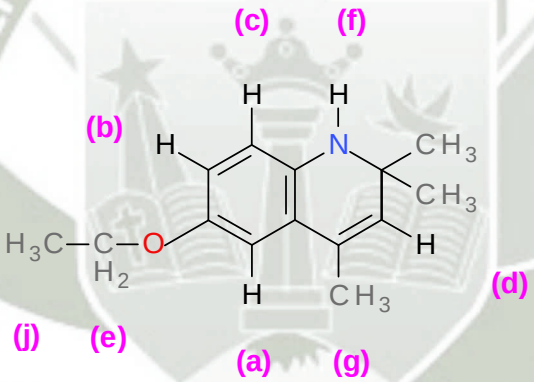


Figura 3.3: Estructura Química de Etoxiquina

b) Procedimiento

- Se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico seco en 0.5ml de disolvente (deuterado) en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético del aparato.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

- El tubo de la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical, el campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación rf excita a todos los núcleos simultáneamente.

- Los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín)

- A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial.

- Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN).

- Una vez obtenidos los Espectros de RMN, procede a determinar los picos que pertenecen a la estructura del Estándar de Etoxiquina. (Ecuación 3.1)

- Una vez, reconocidos los picos de la estructura, se procede a sumar las áreas de los mismos, junto a las áreas restantes.

$$\frac{\sum \text{áreas de picos de todas las señales}}{100\%} = \frac{\sum \text{áreas de picos señal de EQ}}{\%\ \text{etoxiquina}(EQ)}$$

(Ecuación 3.1)

- El resultado que se obtenga de la ecuación anterior, determinara el porcentaje de pureza de nuestro nuevo estándar.

3.3.4. Cuantificación de Etoxiquina en Harina de Pescado

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

A. Método: Cromatografía Liquida de Alta Performance (HPLC)

B. Procedimiento

a. Parámetros Cromatográficos

- Equipo: cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)
- Columna: RP C18
- Fase Móvil: Acetonitrilo : Buffer Fosfato pH 6.6 (70:30)
- Sistema: Isocrático.
- Longitud de onda: 357 nm
- Flujo: 1.2 ml/min
- Volumen de Inyección: 20 µl.
- Tiempo de Retención: aprox. 4 min.
- Tiempo Total de Corrida: 6 min.
- Método de Cálculo: Estándar externo.

b. Preparación de Soluciones de Trabajo

Preparación de Soluciones Estándar:

Se tomaron 15mg del Estándar de Etoxiquina y se diluyeron en 25 ml de Metanol, para obtener una concentración final de 564ppm.

A partir de la solución madre (564ppm), se prepararon 5 soluciones estándar de: 5.64, 16.92, 50.8, 152.3 y 304.6 ppm. Para las cuales se tomaron alícuotas de 100 ul (0.1 ml), 300 ul (0.3 ml), 900 ul (0.9ml), 2.7 ml y 5.4 ml. Se completó hasta 10ml con metanol.

3.3.4.1. Idoneidad del sistema [35, 41,43]

Se preparó una solución estándar a la concentración media de la curva de calibración (45.36 ppm) y se determinaron los siguientes parámetros:

A. Factor de Capacidad

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Es el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna (t_0). Este factor determina la retención del soluto y puede calcularse usando la Ecuación 3.3:

(Ecuación 3.3)

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Dónde:

t_0 = tiempo en el que un compuesto no retenido pasa por el interior del sistema.
t_R = tiempo de retención del compuesto considerado

Son recomendables valores de k' superiores a 1, consiguiéndose una óptima resolución con valores mayores de 2.

B. Número de Platos Teóricos:

Es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y, por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas.

El cálculo se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico, como muestra la Ecuación 3.4:

$$N = 16 \times \left(\frac{t}{w} \right)^2$$ (Ecuación 3.4)

t = tiempo de retención
W = anchura del pico en la línea de base determinado por la tangente ajustada a un % de la altura del pico.

El número de platos teóricos depende del tiempo de elución pero en general se recomienda que sea superior a 2000. Los parámetros sobre los que se puede incidir para

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

modificar el número de platos teóricos son la columna y las diversas condiciones cromatográficas definidas en el método.

C. Factor de Asimetría:

Es una medida de la asimetría de la señal generada por el analito. Existen varias fórmulas de cálculo que toman la anchura de ambos lados del pico a distintas alturas, siendo la más habitual la que se muestra en la Ecuación

$$T = \frac{W_{0.05}}{2F} \qquad \text{(Ecuación 3.5)}$$

Dónde:
W0.05 = anchura de pico al 5% de la altura del pico.
F = distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el frente al 5% de la altura del pico.

Como normal general el factor de asimetría debería encontrarse entre 0.8 y 1.5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2.0

Las señales simétricas son preferibles porque minimizan las imprecisiones en la detección del inicio y el final del pico por parte de los sistemas de integración. Por lo tanto, permites una mejor y más precisa cuantificación del área bajo la curva.

D. Resolución:

Es la medida de la separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias. La fórmula de cálculo para la resolución se lleva a cabo utilizando la Ecuación

(Ecuación 3.6)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

$$R = 2\frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2}$$

Dónde:

t1 y t2 = tiempo de retención

W1 y W2 = anchura del pico por tangentes

Para realizar el cálculo la anchura de pico y el tiempo de retención se deben expresar en las mismas unidades.

El valor mínimo de resolución aceptable debería ser aquel que permita la resolución a la línea base entre los picos de interés, es decir, cuando la señal correspondiente a las últimas trazas de analito llega a la línea de base antes que las primeras trazas del siguiente analito en eluir sean detectadas.

Para picos de tamaño similar se alcanza una resolución a la línea de base con valores de 1.5, aunque es deseable fijar una resolución mayor de 2.0 o si se espera la aparición de posibles interferencias.

3.3.4.2. Protocolo de Validación de la Técnica Analítica

A. Linealidad

Se tomaron 15mg del Estándar de Etoxiquina y se diluyeron en 25 ml de Metanol, para obtener una concentración final de 564ppm.

i. Preparación de la Solución Estándar 5.6 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.1 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

ii. Preparación de la Solución Estándar 16.9 ppm.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Se tomó una alícuota de 0.3 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

iii. Preparación de la Solución Estándar 50.8 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.9 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

iv. Preparación de la Solución Estándar 152.3 ppm.

Se tomó una alícuota de 2.7 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

v. Preparación de la Solución Estándar 304.6. ppm.

Se tomó una alícuota de 5.4 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

Tratamiento Estadístico de los Resultados: [34,41]

Se determina la línea de regresión Y = a + bx de los puntos inyectados por triplicado, así como el coeficiente de regresión lineal (r), para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto. Posteriormente se grafica la curva de calibración como Concentración versus Respuesta (Área). Los cálculos de la pendiente (b), del intercepto (a), y del coeficiente de regresión lineal |(r), se pueden calcular usando las fórmulas 3.7; 3.8 y 3.9 respectivamente, las cuales se muestran a continuación

(Ecuación 3.7)

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

(Ecuación 3.8)

$$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n}$$

(Ecuación 3.9)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right)\left(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}\right)}}$$

Dónde:

- b = pendiente
- a = intercepto
- n = número de mediciones
- x_i = concentración
- y_i = valor medido en el ensayo

i. La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por sí sola la linealidad. En cambio r^2, el coeficiente de determinación, aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de Y explicada por el modelo.

ii. Se propone un criterio de aceptación mínimo de 0.995 para r, y de 0.990 para r^2.

iii. El valor r=1 indica una recta perfectamente lineal, r=-1 una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y r=0 la no correlación entre X e Y.

iv. Sin embargo, es preferible usar un test estadístico para determinar la linealidad, en el cual se calcula un valor de t_r con n-2 grados de libertad y se compra con el t tabulado para el nivel de confianza requerido. La hipótesis nula (H_o) es la no correlación entre X e Y. Si el valor observado de t_r es mayor que t_{tabla}, se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alternativa (H_A), que señala una correlación lineal significativa con la probabilidad calculada. La ecuación 3.10 se usa para calcular el valor de t_r :

(Ecuación 3.10)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Dónde:

- r = Coeficiente de correlación
- r^2 = Coeficiente de determinación
- n = número de mediciones

Además es necesario hacer un análisis de varianza (ANOVA) de la regresión, así como lo muestra la Tabla 3.1 presentada a continuación:

Tabla 3.1: ANOVA para Regresión Lineal

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F
Regresión	1	$\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	SCR_g/GLR_g	CMR_g/CMR_s
Residual	n -2	$\sum(y_i - \hat{y}_i)^2$	SCR_s/GLR_s	
Total	n-1	$\sum(y_i - \bar{y})^2$	SCT/GLT	

Dónde:

- y_i = valor medido en el ensayo
- $\hat{y}_i$ = estimado de y
- $\bar{y}$ = promedio de y
- n = número de mediciones

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Si el valor del F obtenido es mayor al de tablas, para (1, n-2) grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula (H_o): $\beta=0$, y se acepta la alternativa (H_A): $\beta \neq 0$, indicando una relación lineal entre Concentración versus Respuesta.

B. Precisión

i. Preparación de la Solución Estándar 50.8 ppm:

Se tomaron 15mg del estándar de etoxiquina y se diluyeron en 25 ml de Metanol, para obtener una concentración final de 564 ppm.

Luego se tomó una alícuota de 900 ul (0.9ml) de la solución madre, y se enrasó con metanol en una fiola de 10 ml, obteniéndose una concentración final de 50.8 ppm.

Se inyectó 9 veces la solución preparada.

Adicional a este ensayo, se realizó la preparación de tres niveles de concentración (5.6; 16.9 y 50.8 ppm), preparados a partir de la muestra (harina de pescado). Los cuales se inyectaron en el equipo, por triplicado.

ii. Preparación de la Solución 5.6 ppm:

Se tomó 0.12 g (aprox.) de la muestra, y se enraso con metanol en una fiola de 10ml.

iii. Preparación de la Solución 16.92 ppm:

Se tomó 0.38 g (aprox.) de la muestra, y se enraso con metanol en una fiola de 10 ml.

iv. Preparación de la Solución 50.8 ppm:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Se tomó 1.12 g (aprox.) de la muestra, y se enraso con metanol en una fiola de 10ml.

v. Tratamiento Estadístico de los Resultados:

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). El estimador s de la desviación estándar se calcula según la Ecuación 3.11:

(Ecuación 3.11)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - x)^2}{n-1}}$$

Dónde:

- n = número de medidas.
- x_i = valor medido en el ensayo i.
- $\bar{x}$ = estimador de la media poblacional.

Por su parte, la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV) se calcula tal como lo muestra la Ecuación 3.12:

(Ecuación 3.12)

$$\text{RSD} = \frac{\text{s}}{\text{x}} \times 100$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación estándar relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Se recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiado. Los intervalos de confianza para resultados promedios se calcular a partir de la Ecuación 3.13:

(Ecuación 3.13)

$$\bar{x} \pm t \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Dónde:

- $\overline{x}$ = media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.
- t = valor de la t de Student de tablas para n-1 grados de libertad y α = 0.005.
- n = número de análisis.
- s = desviación estándar.

C. Exactitud

Este parámetro se evaluó, realizando el Método de Adición Patrón

a. Método de la Adición Patrón:

i. Preparación de las Soluciones Estándar

- **Preparación de la Solución Madre**

  Para esto se tomó 15mg del estándar de etoxiquina, y se diluyo con metanol, en una fiola de 25ml.

- **Preparación de la Solución con Adición de Estándar 5.6 ppm**

  Se tomó 100ul (0.1ml), de la Solución Madre, y se agregó 0.66g de Muestra (X), luego de enraso con metanol en una fiola de 10ml.

- **Preparación de la Solución con Adición de Estándar 16.9 ppm**

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Se tomó 900ul (0.9ml), de la Solución Madre, y se agregó 0.66g de Muestra (X), luego de enraso con metanol en una fiola de 10ml

- **Preparación de la Solución con Adición de Estándar 152.3 ppm**

Se tomó 2.7ml, de la Solución Madre, y se agregó 0.66g de Muestra (X), luego de enraso con metanol en una fiola de 10ml.

b. Tratamiento Estadístico de los Resultados: [34,41]

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Matemáticamente puede expresarse como la Recuperación, que se calcula según muestra la Ecuación 3.14:

(Ecuación 3.14)

$$Recuperación = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \times 100$$

Dónde:

$\bar{x}$= valor promedio.

$\hat{x}$= valor verdadero.

Para determinar que el valor medio no difiera significativamente del aceptado como referencia puede utilizarse un ensayo t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando el t experimental (t_{ob}), que se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido, generalmente p = 0.05. El valor de t_{ob} puede calcularse usando la Ecuación 3.15:

(Ecuación 3.15)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$t_{ob} = \frac{|100 - R| \times \sqrt{n}}{RSD}$$

Dónde:

- R = recuperación porcentual.
- n = número de análisis.
- RSD = desviación estándar relativa.

D. Límite de Detección y Límite de Cuantificación:

a. Preparación de las Soluciones Estándar:

Se tomaron 15mg del Estándar de Etoxiquina y se diluyeron en 25 ml de Metanol, para obtener una concentración final de 564ppm.

i. Preparación de la Solución Estándar 5.6 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.1 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

ii. Preparación de la Solución Estándar 16.9 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.3 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

iii. Preparación de la Solución Estándar 50.8 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.9 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

iv. Preparación de la Solución Estándar 152.3 ppm.

Se tomó una alícuota de 2.7 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

v. Preparación de la Solución Estándar 304.6 ppm.

Se tomó una alícuota de 5.4 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

b. Tratamiento Estadístico de los Resultados: 34

Los límites de detección y cuantificación también pueden estimarse a partir de la curva de regresión, por extrapolación a concentración cero. Así:

- Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: b
- Se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl}.
- Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración, se calcula la recta correspondiente a concentración vs s y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl}, correspondiente a la desviación estándar del blanco.
- Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n' medidas individuales, utilizando las Ecuaciones 3.16 y 3.17 :

(Ecuación 3.16)

$$Límite\ de\ Detección = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

(Ecuación 3.17)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$Límite\ de\ Cuantificación\ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

E- Selectividad

Para el desarrollo de este parámetro se utilizó nuevamente el Método de Adiciones Patrón, ya que es necesario conocer que el grado de respuesta de la técnica sea únicamente proporcionado por el analito de interés en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la matriz.

Se prepararon 5 soluciones estándar etoxiquina, adicionalmente se agregó una cantidad conocida de muestra (harina de pescado), para cada nivel de concentración, y se completó el volumen con metanol.

a. Preparación de las Soluciones Estándar:

Se tomaron 15mg del Estándar de Etoxiquina y se diluyeron en 25 ml de Metanol, para obtener una concentración final de 564ppm.

i. Preparación de la Solución Estándar 5.6 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.1 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

ii. Preparación de la Solución Estándar 16.9 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.3 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

iii. Preparación de la Solución Estándar 50.8 ppm.

Se tomó una alícuota de 0.9 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

iv. Preparación de la Solución Estándar 152.3 ppm.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Se tomó una alícuota de 2.7 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

v. Preparación de la Solución Estándar 304.6 ppm.

Se tomó una alícuota de 8 ml de la solución madre, y se enrasa con metanol en una fiola de 10 ml.

3.3.4.3 Determinación Cuantitativa de Etoxiquina en muestra de harina de pescado

a. Preparación de la Muestra para Análisis:

Se tomaron 0.66g (aproximadamente]) de cada muestra, que se llevó a una fiola de 10ml, en donde se disolvió con metanol.

La solución preparada, fue cuidadosamente homogenizada, y filtrada antes de inyectarla al equipo por triplicado

b. Expresión de Resultados:

Se halló la media de las áreas obtenidas. Luego, se interpoló dicha área media en la gráfica de calibración de la Linealidad del Sistema, utilizando la respectiva ecuación de regresión lineal previamente calculada y con esto, se obtiene una concentración µg/ml.

(Ecuación 3.18)

$$Y = a + bx$$

Finalmente, se realizan los cálculos respectivos tomando en cuenta las diluciones de la muestra que se hicieron para preparar la solución de análisis, y se obtiene una concentración final de µg/g.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

(Ecuación 3.19)

$$Etoxiquina(\mu g / g) = \frac{C \times FD}{W}$$

C = concentración de etoxiquina (µg/ml), obtenida a partir de la ecuación de regresión lineal, de la Gráfica de Calibración Promedio.

FD = factor de diluciones (ml).

W = cantidad de muestra pesada (g).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de la Evaluación del estándar Etoxiquina 75%

Como se pudo apreciar en la sección 3.3.1., el estándar de etoxiquina no se encontraba en las condiciones adecuadas para realizar el ensayo.

A esto se le añadió un análisis de **Cromatografía en Capa Fina (TLC)** 3.3.1. (a), el cual nos permitió observar, en la figura 4.1 que existe la presencia de por lo menos dos componentes, sugiriendo que no estamos frente a un material de referencia adecuado para el análisis.

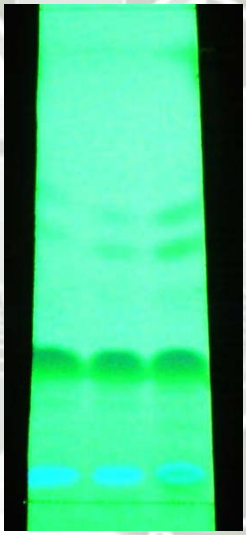


Figura 4.1: Cromatografía en Capa Fina del Estándar de Etoxiquina 75%

Algunos autores han purificado la etoxiquina utilizando cromatografía en columna seguida de destilación al vacío obteniendo un material de elevada pureza. Como se menciona en Ethoxyquin and its derivatives 2005, 112 por Błaszczyk, A.; Skolimowski, J.[44]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4.2. Obtención del Estándar Purificado

Para realizar la obtención del estándar purificado de etoxiquina se procedió tal y como se describe en la sección 3.3.2 (a).

En el presente caso y debido a las limitaciones instrumentales se procedió a hacer la destilación a alto vacío obteniendo tres fracciones recolectando la fracción con un punto de ebullición de 105°C-108°C (p =1-2mmHg)

Como podemos apreciar en la figura 4.2 el producto final fue un líquido viscoso de color amarillo pálido, completamente distinto al estándar con el que se contaba en un principio.
El nuevo producto fue guardado en frascos ámbar bien cerrados y bajo refrigeración a -4ºC.



Figura 4.1: Estándar de Etoxiquina después del Proceso de Destilación al Vacío

Así mismo como se detalla en la sección 3.3.2. (b), se realizó de nuevo una cromatografía de Capa Fina (TLC) al nuevo producto, en donde podemos apreciar en la figura 4.3, que ya no se observa la presencia de interferentes.
Estos resultados nos indican que estamos frente a una sustancia de elevada pureza.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

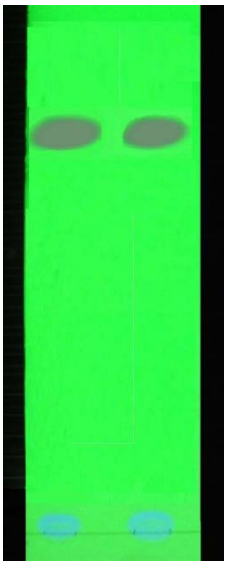


Figura 4.3 Estándar de Etoxiquina después de Destilación al Vacío

Para confirmar la ausencia de interferentes se hizo un examen de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

4.3. Determinación Indirecta del Porcentaje de Pureza de Etoxiquina

Método: Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En el Espectro de Resonancia Magnética Nuclear que corresponde al estándar de Etoxiquina, podemos observar las áreas debajo de cada pico, tanto de aquellos que corresponden al estándar de Etoxiquina, así como también de los posibles interferentes. (Figura 4.4)

En espectroscopia de RMN el proceso de integración es encontrar el área debajo de cada pico y se debe de recordar que el área es directamente proporcional al número de protones de hidrógeno en la molécula. A su vez encontramos en la parte superior, el desplazamiento de cada pico, los cuales nos ayudaran a identificar aquellos picos que corresponden al estándar de etoxiquina

El cálculo de las áreas se hace tomando en cuenta a todas las señales presentes. En el presente experimento el operador del equipo hizo el cálculo de las áreas para todas las señales, que para el presente caso se incluyó tanto a las señales de la etoxiquina como a las impurezas. (Ecuación 3.1

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

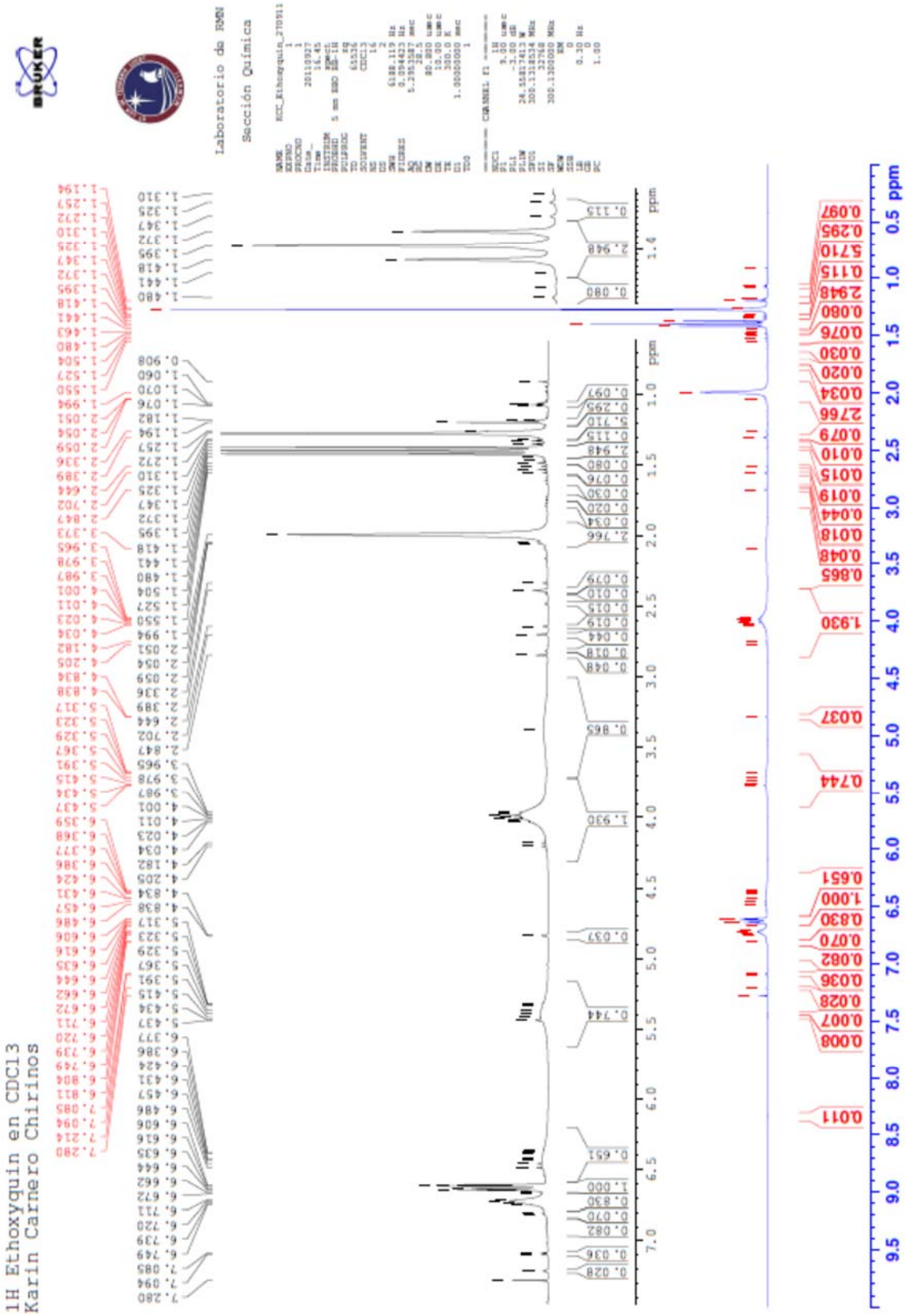
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

De acuerdo a la fórmula de la etoxiquina (1,2- dihidro-6- etoxi-2,2,4- trimetilquinolona) deberá dar 9 desplazamientos (a→k), como se puede apreciar en la figura 4.3.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

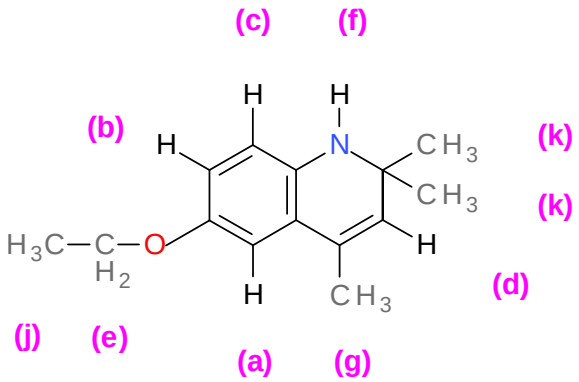


Figura 4.5: Estructura química de la Etoxiquina

La tabla N° 4.1, nos muestra las características de los protones señalando de "a" hasta "k":

Tabla N° 4.1: Análisis de las señales Protónicas de la Etoxiquina

Protón o familia de protones	Tipo de Señal	Integración Teórica
a	M	1
b	M	1
c	M	1
d	M	1
e	Cuarteto	2
f	Singulete, ancho	1
g	Singulete	3
j	Triplete	3
k	Singulete	6

M: Multiplete

Si se toman en cuanta siguientes señales: g, j, k, y en menor grado e, se puede apreciar del espectro de RMN lo descrito en la tabla N°4.2:

Tabla N°4.2: Comparación de Integración Experimental – Teórica del estándar de Etoxiquina

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tipo de protón	Desplazamiento (ppm)	Tipo de desdoblamiento	*Integración experimental*	*Integración teórica*
k	1.257-1.272	Singulete	*5.710*	*6*
j	1.395	Triplete	*2.948*	*3*
g	1.994	Singulete	*2.766*	*3*
e	4.011	Multiplete (cuarteto)	*1.930*	*2*

Se deduce pues que estamos frente a la etoxiquina con un elevado grado de pureza pues la integración experimental se aproxima a la integración teórica, pero se aprecia todavía cierta cantidad de interferentes que no han podido ser removidos en una sola destilación. En la tabla N° 4.3 se observa la suma de las áreas que corresponden a todos los picos presentes en el espectro de RMN, así como también la suma de las áreas que corresponden a los picos del estándar de Etoxiquina:

Tabla N° 4.3: Áreas de todas las señales presentes en el Espectro de RMN

Áreas de todas las señales		Áreas de las Señales de Etoxiquina
0.011	0.044	0.651
0.008	0.019	1
0.007	0.015	0.83
0.028	0.010	0.07
0.036	0.079	0.744
0.082	2.766	
0.070	0.034	1.93
0.830	0.020	
1.000	0.030	0.865
0.651	0.076	
0.744	0.080	2.766
0.037	2.948	
1.930	0.115	2.948
0.865	5.71	
0.048	0.295	5.71
0.018	0.097	
SUMA TOTAL		**SUMA (EQ)**
18.703		**17.514**

Luego de identificar correctamente cada señal, y de haber sumado las áreas correspondientes, se hace uso de la ecuación 3.1, la cual nos permitirá determinar el nuevo grado de pureza del nuevo estándar de etoxiquina.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

$$\frac{\sum \text{áreas de picos de todas las señales}}{100\%} = \frac{\sum \text{áreas de picos señal de EQ}}{\%\ \text{etoxiquina(EQ)}}$$

$$\frac{18.703}{100\%} = \frac{17.514}{\%\ etoxiquina(EQ)}$$

$$\%\ \text{etoxiquina} = 94\%$$

Así mismo, el espectro de RMN (^{1}H) de etoxiquina del presente trabajo se cotejo con una base de datos SBSD (anexos), mostrando excelente correlación entre ambas muestras.

4.4 Determinación Cuantitativa de Etoxiquina en muestras de Harina de pescado

Para la determinación cuantitativa de Etoxiquina se cumplieron con los parámetros cromatográficos mencionados en la sección 3.3.4.

Esta cuantificación se llevó a cabo en 3 etapas: Idoneidad del Sistema, Desarrollo del Protocolo de Validación y Cuantificación de Etoxiquina en muestras de harina de pescado. Estas etapas se desarrollan a continuación:

4.4.1 Idoneidad del Sistema

Se evaluaron los parámetros de idoneidad del sistema, tal como detalla el procedimiento 3.3.4.1.

Los resultados generados por el software EZChrom Elite del equipo HPLC, derivan de las Ecuaciones 3.3 (factor de capacidad), 3.4 (número de platos teóricos), 3.5 (factor de asimetría) y 3.6 (resolución).A continuación, la tabla 4.4 muestra los resultados de estos parámetros:

TABLA 4.4: Parámetros de Idoneidad del Sistema

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Parámetros	*Factor de Capacidad (K')*	*Numero de Platos Teóricos (N)*	*Factor de Asimetría (T)*	*Resolución (R)*
Valores	4.4	7202	1.03	5.26

Todos los parámetros: k', N, T y R, se encuentran dentro de los niveles óptimos mencionados en 3.3.4.1 (A), (B), (C) y (D) respectivamente. Por lo tanto, se puede afirmar que el sistema (equipo, reactivos, analista) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la cual se ha establecido y validado la técnica.

Siendo la evaluación de la idoneidad del sistema un requisito previo para la realización de la validación del método, se puede empezar a desarrollar el protocolo de validación respectivo.

4.4.2 Protocolo de Validación de la Técnica Analítica

A. LINEALIDAD

Para la determinación de la Linealidad del Sistema, se prepararon 3 gráficas de calibración distintas, procediendo tal como se indica en 3.3.4.2 (A). Cada nivel de concentración fue inyectado por triplicado.

A continuación se muestran los cálculos para conocer las concentraciones finales de la solución madre y soluciones estándar en base a las diluciones realizadas del estándar de Etoxiquina:

- *Preparación de la Solución Madre:*

$$\frac{15mg}{25ml} \times \frac{1000ml}{1L} \times \frac{94}{100} = 564\,ppm$$

- *Preparación de las Soluciones Estándar:*

A partir de la solución madre (564ppm), se prepararon 5 soluciones estándar de:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$\text{Estándar 1: } \frac{564\,ppm \times 0.1ml}{10ml} = 5.64\,ppm$$

$$\text{Estándar 2: } \frac{564\,ppm \times 0.3ml}{10ml} = 16.92\,ppm$$

$$\text{Estándar 3: } \frac{564\,ppm \times 0.9ml}{10ml} = 50.76\,ppm$$

$$\text{Estándar 4: } \frac{564\,ppm \times 2.7ml}{10ml} = 152.28\,ppm$$

$$\text{Estándar 5: } \frac{564\,ppm \times 5.4ml}{10ml} = 304.56\,ppm$$

En las Tablas 4.5, 4.6 y 4.7 presentadas a continuación se encuentran las áreas obtenidas para cada uno de los niveles de concentración inyectados por triplicado para las 3 gráficas de calibración creadas:

TABLA 4.5: Concentración y Áreas para la Gráfica de Calibración N° 1

Concentración	AREA 1	AREA2	AREA3	Promedio	S	%CV
5.64	173660	174123	174144	173976	274	0.16
16.92	701514	702013	693077	698868	5021	0.72
50.76	2113294	2098921	2085211	2099142	14043	0.67
152.28	7016236	7015579	7006872	7012896	5227	0.07
304.56	13803075	13874792	13865181	13847683	38929	0.28

TABLA 4.6: Concentración y Áreas para la Gráfica de Calibración N° 2

Concentración	AREA 1	AREA2	AREA3	Promedio	s	%CV
5.64	175055	176013	175743	175604	494	0.28

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

16.92	696822	695341	692881	695015	1991	0.29
50.76	2124601	2135076	2117493	2125723	8845	0.42
152.28	7029014	7018977	7038202	7028731	9616	0.14
304.56	13936451	13894418	13901218	13910696	22562	0.16

TABLA 4.7: Concentración y Áreas para la Gráfica de Calibración N° 3

Concentración	AREA 1	AREA2	AREA3	Promedio	s	%CV
5.64	173884	172901	173694	173493	521	0.30
16.92	702441	701356	701931	701909	543	0.08
50.76	2117659	2070755	2079894	2089436	24865	1.19
152.28	7012262	7020523	7013023	7015269	4566	0.07
304.56	13869487	13853414	13885703	13869535	16145	0.12

Utilizando estos datos se construyen las gráficas de calibración de Concentración vs Área Promedio, las cuales se muestran a continuación en las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8:

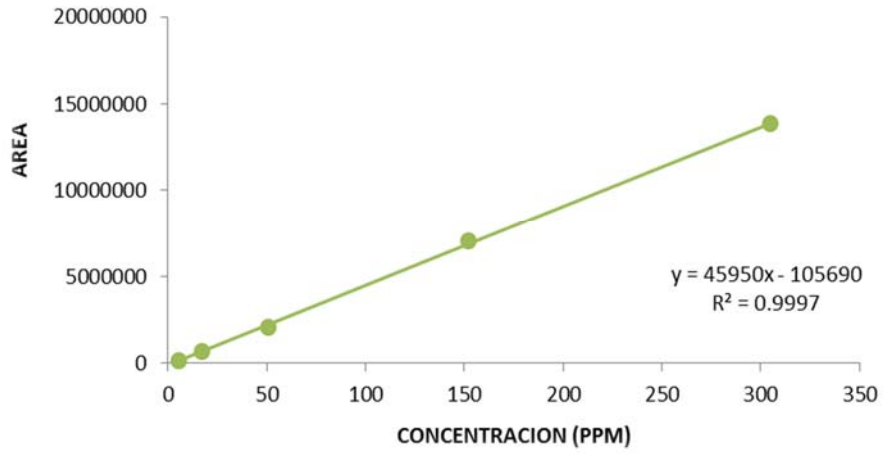


Figura 4.6: Grafica de Calibración N° 1

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

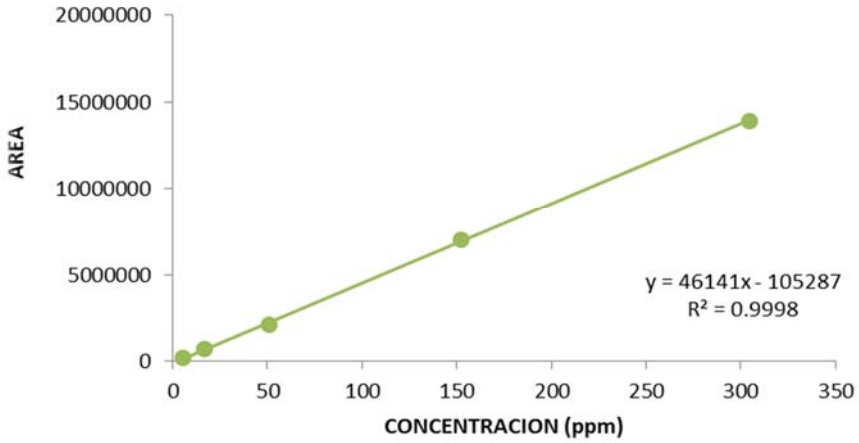


Figura 4.7: Grafica de Calibración N° 2

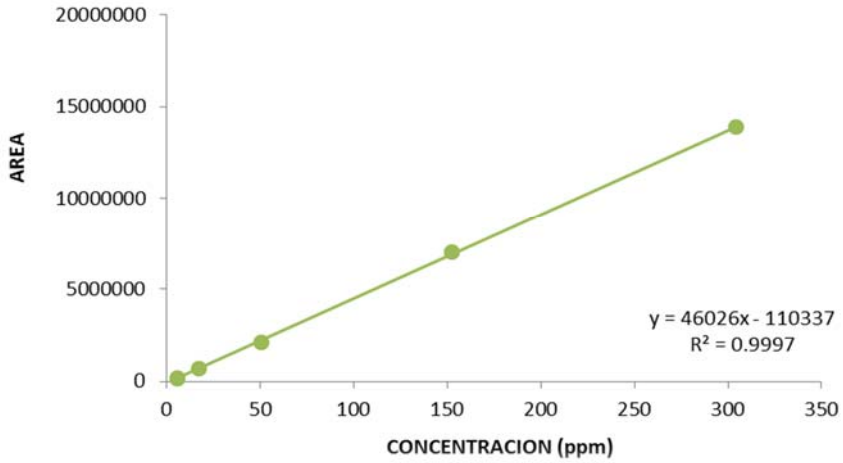


Figura 4.8: Gráfica de Calibración N° 3

Se deduce la existencia de una aparente relación lineal entre las concentraciones del Estándar de Etoxiquina y las Respuestas (Áreas) generadas por el equipo.

Se realiza un Análisis de Regresión Lineal a los datos obtenidos para las 3 gráficas de calibración, utilizando el programa MO Excel 2007, obteniendo los valores correspondientes al intercepto (a) y la pendiente (b), que derivan de las ecuaciones 3.7 y 3.8. Estos valores se detallan a continuación en la tabla 4.8:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA 4.8: Análisis de Regresión Lineal

GRÁFICA DE CALIBRACIÓN Nº 1						
	Coeficientes	**Error típico**	**Estadístico t**	**Probabilidad**	**Inferior 95%**	**Superior 95%**
Intercepto	-105690.3631	65434.94756	-1.615197491	0.204680576	-313933.5702	102552.844
Pendiente	45950.30899	424.4360099	108.2620417	1.73744E-06	44599.56418	47301.0538
GRÁFICA DE CALIBRACIÓN Nº 2						
	Coeficientes	**Error típico**	**Estadístico t**	**Probabilidad**	**Inferior 95%**	**Superior 95%**
Intercepto	-105286.7543	57456.94985	-1.832445937	0.164268885	-288140.4121	77566.90345
Pendiente	46141.1689	372.687676	123.8065326	1.16182E-06	44955.11038	47327.22742
GRÁFICA DE CALIBRACIÓN Nº 3						
	Coeficientes	**Error típico**	**Estadístico t**	**Probabilidad**	**Inferior 95%**	**Superior 95%**
Intercepto	-110336.998	66927.09648	-1.648614744	0.197786476	-323328.889	102654.8929
Pendiente	46026.34549	434.1146565	106.0234774	1.8498E-06	44644.7989	47407.89207

También se obtienen los coeficientes de correlación (r), que deriva de la Ecuación 3.9 y coeficientes de determinación (r2), para las 3 gráficas de calibración. Estos datos se observan en la Tabla 4.9:

TABLA 4.9: Coeficiente de Regresión Lineal

Grafica de Calibración	Coeficiente de Correlación (r)	Coeficiente de Determinación (r2)	Observaciones
Nº 1	0.9998	0.9997	5
Nº 2	0.9999	0.9998	5
Nº 3	0.9998	0.9997	5

Siendo los valores de r y r^2 mayores a los niveles mínimos establecidos de 0.995 y 0.990 respectivamente, se puede confirmar que el método es Lineal.[41]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Esta correlación lineal se ve confirmada realizando un Test Estadístico t, donde el valor de t_r se obtienes de la ecuación 3.10 y se compara con el valore t_{tablas} para (n-2) grados de libertad[34], como se detalla en la sección 3.3.4.2. (A). La Tabla 4.10que aparece a continuación muestra estos resultados:

TABLA 4.10: Valores del Test Estadístico t para la Determinación de Linealidad

Gráfica de Calibración	t *experimental*	t *tablas* *(0.05, 3)*
Nº 1	99.98	3.182
Nº 2	122.46	3.182
Nº 3	99.98	3.182

Como se observa en la tabla 4.10, para las 3 gráficas creadas: $t_r > t_{tablas}$. La hipótesis nula (H_o) es la no correlación entre X e Y; la hipótesis alternativa (H_A) señala una correlación lineal significativa con la probabilidad calculada. Por lo que, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Por último, se realiza un análisis de varianzas (ANOVA), siguiendo el modelo propuesto en la Tabla 3.1. Donde el valor obtenido de F se compara con el valor de F_{tablas} para (1,n-2) grados de libertad, como se detalla en 3.3.4.2 (A).

Los datos de este análisis generado por el programa MO Excel 2007 se muestran en la siguiente Tabla 4.11:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA N° 4.11: Análisis de Varianza para la Linealidad

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	F *tabla*
GRAFICA Nº 1					
Regresión	1	1.32232E+14	1.32232E+14	11720.66967	10.13
Residuos	3	33845856560	11281952187		
Total	4	1.32266E+14			
GRAFICA Nº 2					
	Grados de libertad	**Suma de cuadrados**	**Promedio de los cuadrados**	**F**	**F *tabla***
Regresión	1	1.33333E+14	1.33333E+14	15328.05751	10.13
Residuos	3	26095830745	8698610248		
Total	4	1.33359E+14			
GRAFICA Nº 3					
	Grados de libertad	**Suma de cuadrados**	**Promedio de los cuadrados**	**F**	**F *tabla***
Regresión	1	1.3267E+14	1.3267E+14	11240.97777	10.13
Residuos	3	35407067650	11802355883		
Total	4	1.32705E+14			

Como se observa en la tabla, para las 3 gráficas creadas: $F > F_{tablas}$. La hipótesis nula (H_o) afirma que la pendiente es igual a 0; mientras que la hipótesis alternativa (H_A) afirma que la pendiente es distinta de cero. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

Gráfica de Calibración Promedio del Sistema: La Figura 4.9 presentada a continuación es una gráfica de calibración promedio de las 3 gráficas de calibración preparadas para evaluar la linealidad del sistema.

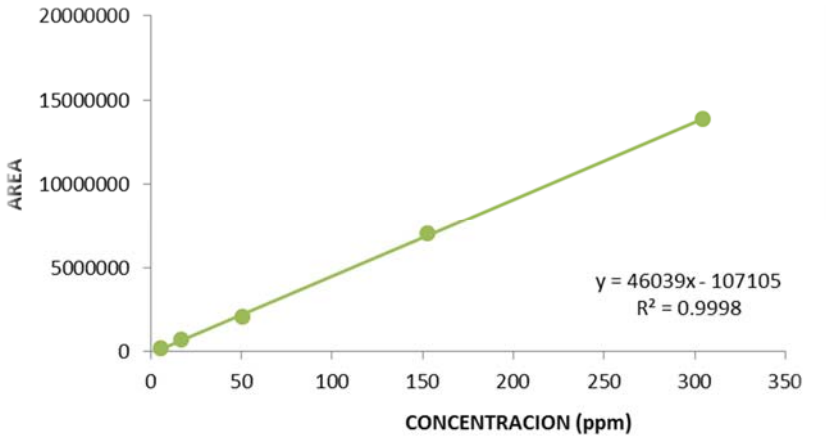


Figura 4.9: Gráfica de Calibración Promedio

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

B. PRECISIÓN

Para la evaluación de la precisión se siguió el procedimiento detallado en 3.3.4.2 (B). De este modo, la solución preparada del estándar de Etoxiquina 50.76 ppm se inyectó 9 veces en el equipo.

Como se indicó en 3.3.4.2 (B), la precisión se evalúa en términos del Coeficiente de Variación (CV) [34,41], el cual se calcula utilizando la Ecuación 3.12.
Se evaluó el CV de las áreas así como de los tiempos de retención correspondientes a cada una de las 9 réplicas realizadas. Estos datos se muestran a continuación en la Tabla 4.12:

TABLA 4.12: Evaluación de la Precisión mediante Áreas y Tiempos de Retención

Nº de Repetición	Áreas	Tiempo de Retención
1	2124601	4.10
2	2137659	4.10
3	2143294	4.10
4	2135076	4.09
5	2127755	4.09
6	2159921	4.08
7	2137493	4.10
8	2129894	4.10
9	2135211	4.09
Promedio	2136767	4.10
CV %	0.46	0.18

El CV % obtenido para las áreas (0.46%) y para los tiempos de retención (0.18%) es inferior al valor límite aceptado de 2%, los valores de CV obtenidos indican una buena precisión del sistema.

CV altos en relación al área pueden deberse a errores en la carga del loop, o a pérdidas que puedan ocasionarse a nivel del inyector, detector o bomba. Por otro lado, CV altos en los tiempos de retención se debe a problemas en la bomba, que no entrega la cantidad de solvente requerida, y también a pérdidas en el sistema.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Por lo tanto, dado que los CV obtenidos indican una buena precisión del sistema, se puede asegurar un buen funcionamiento del equipo, indispensable para llevar a cabo el proceso de validación.

Adicional a este ensayo, se realizó la preparación de tres niveles de concentración, preparados a partir de la muestra (harina de pescado), la preparación de las muestras se detallan en la sección 3.3.4.2 (B). Los resultados se muestran en la siguiente tabla 4.13:

TABLA 4.13: Evaluación de la Precisión a partir de la muestra

Nº de Repetición	Muestra 5.6ppm		Muestra 16.9ppm		Muestra 50.8ppm	
	Área	Cc. Hallada	Área	Cc. Hallada	Área	Cc. Hallada
1	171328	6.05	691176	17.34	2179705	49.67
2	170355	6.03	700967	17.55	2181512	49.71
3	170568	6.03	701149	17.56	2191319	49.92
Media		6.04		17.48		49.77
S		0.01		0.12		0.14
CV%		0.18		0.71		0.27

Como se observa en la tabla, los CV obtenidos (0.18, 0.71, 0.27%) son inferiores al límite máximo aceptado: 2%. Esto indica una buena precisión del método.

También se recomienda incluir los límites de confianza para los niveles de concentración estudiados como se indica en la sección 3.3.4.2. (B), utilizando la ecuación 3.13. Se puede apreciar los resultados en la tabla 4.14 a continuación:

TABLA 4.14: Limites e Confianza para la evaluación de la Precisión

Nivel de Concentración (ppm)	Límites de Confianza
5.6	6.02 - 6.06
16.9	17.3 - 17.8
50.8	49.4- 50.1

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Se observa que, las concentraciones obtenidas en la tabla, se ubican dentro de los límites de confianza establecidos, para cada nivel de concentración.

C. EXACTITUD

Para evaluar la exactitud se utilizó el método de las adiciones patrón, tal como se describe en la 3.3.4.2 C (a), donde se prepara una solución de la muestra, la que se añade cantidades conocidas del estándar de Etoxiquina a 3 niveles de concentración. Se inyectó cada solución por triplicado. A continuación, en la Tabla 4.15 se muestran las áreas, de la solución de la muestra (x), y de aquellas con el estándar agregado (x+504, x+ 15.12 y x+136.08 ppm):

TABLA 4.15: Método de Adicción Patrón para la evaluación de la Exactitud

Concentración Teórica	*Muestra*	*Muestra + 5.6ppm*	*Muestra + 16.9ppm*	*Muestra + 152.3ppm*
AREAS	1265854	1406210	1921612	8231461
	1233260	1410217	1915800	8245154
	1233977	1408212	1938775	8248027
Media	1244364	1408213	1925396	8241547
S	18615	2004	11946	8852
CV%	1.50	0.14	0.62	0.11

Luego, se determina el porcentaje de recuperación como se indicó en 3.3.4.2. C (b), utilizando la Ecuación 3.14. Para ello se halló primero las respuestas experimentales netas de los 3 niveles de concentración estudiados, y después se hallaron las respuestas teóricas (verdaderas) por interpolación en la ecuación de regresión lineal del sistema.[41] Estos resultados se muestran en la Tabla 4.16:

TABLA 4.16: Determinación del Porcentaje de Recuperación

Concentración (ppm)	Resp Exp. - Blanco	Interpolación	Recuperación (%)
5.6	163849	150713	108.7
16.9	681032	670954	101.5
152.3	6997183.7	6904635	101.7
Media			**103.8**
CV%			**4.06**

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Como se observa, los porcentajes de recuperación (108.7, 101.5 y 101.7%).podrían parecer lejanos a la recuperación ideal: 100%. Sin embargo, cuando se estudia el porcentaje de recuperación de un analito presente en muestras, como es el caso de la harina de pescado, se deben considerar límites de aceptación más amplios que los acordados en el estudio de una especialidad farmacéutica con principios activos puros.

Esto se debe a la dificultad que presenta la recuperación del analito, en función de la compleja naturaleza de la matriz.[41]

A pesar de esto, la recuperación promedio obtenida (103.8%), parece ser aceptable. Pero es necesario realizar un test t para confirmar que la exactitud del método es apropiada, como se indica en 3.3.4.2 C (b), donde el t_{ob} se calcula utilizando la Ecuación 3.15, y el t_{tablas} se calcula para (n-1) grados de libertad y p=0.05 [38]. Estos cálculos se muestran a continuación:

(Ecuación 3.15)

$$t_{\exp} = \frac{|100 - 103.8| \times \sqrt{3}}{4.06} = 1.62$$

$$t_{tablas}(\alpha = 0.05; g = 3 - 1 = 2) = 4.303$$

Se observa que: t exp. < t tablas, no existe, diferencia significativa entre la recuperación media, y 100% (se acepta la hipótesis nula) por lo que la exactitud es correcta.

D- LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para determinar el límite de detección y de cuantificación, se desarrolló como se detalla en la sección 3.3.4.2 D (a). Se tomaron los datos de la Grafica Promedio, que se obtuvo en el parámetro de Linealidad.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA 4.17: Datos de Gráfica de Calibración Promedio para Determinar Limite de Detección y Limite de Cuantificación

Concentración	AREA 1	AREA2	AREA3	Promedio	s	%CV
5.64	173976	175604	173493	174357	1106	0.63
16.92	698868	695015	701909	698597	3455	0.49
50.76	2099142	2125723	2089436	2104767	18786	0.89
152.28	7012896	7028731	7015269	7018965	8540	0.12
304.56	13847683	13910696	13869535	13875971	31996	0.23

A partir de estos datos se halla la ecuación de regresión lineal: Y = 46039x -107105
Como se indicó en 3.3.4.2 D (b) el valor de "Ybl" se obtiene por extrapolación de la respuesta a concentración cero y el valor de "b" es el valor de la pendiente:

- Ybl : 107105
- b : 46039

Siguiendo con el procedimiento detallado en 3.3.4.2 D (b), se determinó la desviación estándar de las áreas correspondiente a cada concentración, construyéndose una gráfica de concentración de Etoxoquina vs desviación estándar. Esta gráfica se presenta en la siguiente Figura 4.10:

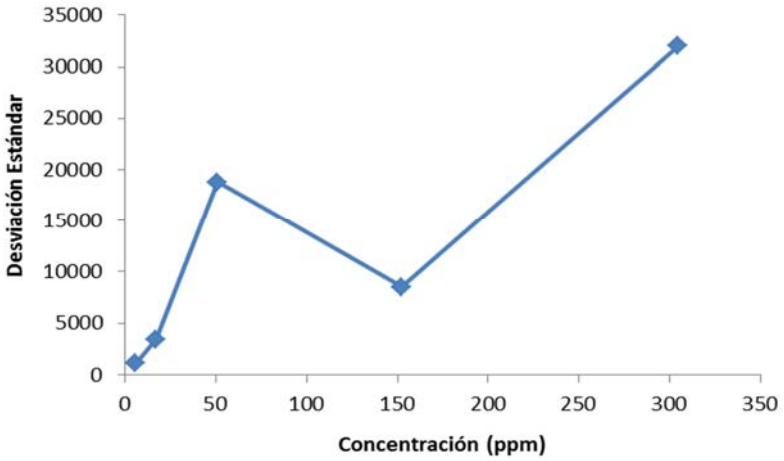


Figura 4.10: Gráfica Concentración de etoxiquina vs Desviación Estándar

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Del mismo modo, se halla la ecuación de regresión lineal a partir de estos datos: Y=84.464x – 3820.7, donde el valor de "Sbl" se halla por extrapolación de la desviación estándar a concentración cero:

- **Sbl** **:** 3820.7

Con los datos obtenidos, se calcula el límite de detección y cuantificación, utilizando las Ecuaciones 3.26 y 3.17 respectivamente:

Límite de Detección:

$$LD = \frac{107105 + 3(3820.7)}{46039} \times \frac{1}{\sqrt{5}} = 1.15\,ppm$$

Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{107105 + 10(3820.7)}{46039} \times \frac{1}{\sqrt{5}} = 1.41\,ppm$$

De este modo, se halla un límite de detección de 1.15 ppm, que representa la cantidad mínima de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada por el método analítico que se propone; y un límite de cuantificación de 1.41 ppm que representa la cantidad mínima de analito que este método puede cuantificar con precisión y exactitud apropiadas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

E- SELECTIVIDAD

Este parámetro se desarrolló como se indica en la sección 3.3.4.2. E (a), continuación en la figura 4.11, se aprecia la Curva de Calibración Estándar Promedio, y la Curva de Calibración por Adición Estándar:

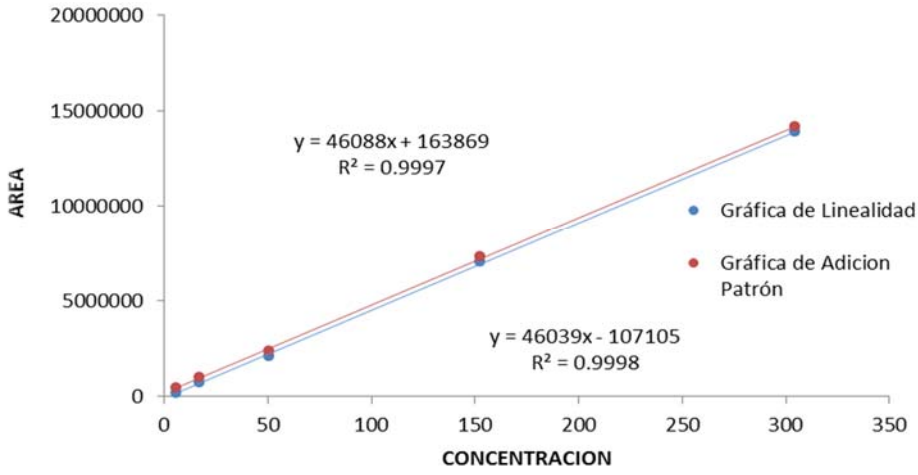


Figura 4.7: Grafica de Adición Patrón y Grafica de Linealidad

Se realiza una prueba t para dos muestras emparejadas, donde observaremos la probabilidad, si hay diferencia significativa entre las pendientes. Los resultados se aprecian en la tabla 4.18.

TABLA 4.18: Análisis Estadístico para las pendientes del Método de Adición Patrón y Estándar

	ESTANDAR	ADICIÓN PATRON.
Media	46039	46088.3
Varianza	2311	151643
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.799	
P(T<=t) una cola	0.106	
Valor crítico de t (una cola)	2.9199	
P(T<=t) dos colas	0.2137	
Valor crítico de t (dos colas)	4.303	

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Al aplicar una prueba t para dos muestras emparejadas, observamos que no existe diferencia significativa entre las pendientes del método de Adicción de Patrón ($p > 0,05$) y las pendientes del estándar. Por lo tanto el Método es selectivo.

4.4.3 Cuantificación de Etoxiquina en muestras de harina de Pescado

Se prepararon 5 distintas muestras, tal y como se detalla en la sección 3.3.4.3. (a), las cuales se inyectaron por triplicado. En la tabla 4.19 encontramos los pesos para cada muestra. En la tabla 4.20, podemos apreciar las áreas obtenidas para cada muestra.

TABLA 4.19: Peso de Muestra

Muestra (g)	Peso (gr)
Muestra A	0.6633
Muestra B	0.6614
Muestra C	0.6618
Muestra D	0.6626
Muestra E	0.6613

TABLA 4.20: Áreas Obtenidas

	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D	Muestra E
AREAS	1429832	1205288	978886	1330199	173911
	1410399	1270239	982693	1325985	180411
	1421166	1225647	981198	1317889	175910
Media	**1420466**	**1233725**	**980926**	**1324691**	**176744**

Para obtener la concentración de etoxiquina en µg/ml, se trabajó tal y como se indica en la sección 3.3.4.3 (b), se pueden observar las concentraciones obtenidas de la interpolación de las medias para cada muestra, en la tabla 4. y la concentración final en la tabla 4.21.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA 4.21: Interpolación de áreas Promedio de cada Muestra

Concentración (ppm)	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D	Muestra E
	33.18	29.12	23.63	31.09	6.17

TABLA 4.22: Concentración de Etoxiquina en muestras de Harina de Pescado

Concentración de Etoxiquina en Muestra (µg/g)	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D	Muestra E
	500.23	440.28	357.06	469.21	93.30

Finalmente en la tabla superior, se puede apreciar que las muestras A, B, C, y D, cumplen con los valores requeridos, exceptuando la muestra E, la cual se encuentra por debajo de los valores requeridos, probablemente por el almacenamiento inadecuado de la misma.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CONCLUSIONES

- **Primera:** Se pudo purificar por Destilación al Vacío (1-2 mmHg; 105°C-108°C) el estándar de Etoxiquina, y así estimar un grado de pureza de 94%, por prueba de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMNN ^{1}H).

- **Segunda:** Se validó la Técnica Analítica usada para la Cuantificación de Etoxiquina por HPLC, evaluando los parámetros de linealidad (de 5.64 a 304.6ppm), selectividad, exactitud, precisión límite de detección (1.15 ppm), y de cuantificación (1.40 ppm).

- **Tercera:** Es posible cuantificar etoxiquina presente en muestras de harina de pescado.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernando Kleeberg/Manuel Nieto; Industria Pesquera en el Perú
2. IFFO (The International Fishmeal and Fish Oil Organization)
3. Roberto Tapia Suárez, Contabilidad de Costos Pesqueros/ CIDEI (Centro de Investigación para el Desarrollo Empresarial e Institucional)
4. FAO (The Food and Agriculture Organization)
5. Barbara Bouyet, Akita Treasure of Japan , Volumen 2; 2002
6. M. Braden, A. N.Gent, rubber Chem. Technol. 1962
7. Kira-Othmer Food and Feed Technology. volume 1 2008
8. Amer. Chem. Soc, W.A. Prior, T. Strickland, D.F. Church, j. 1988)
9. K. P. Battjes, A. M. Barolo, P. Dreyfuss, J. Adhesion Sci. and Tech., 5, 1991, 785.
10. L. Tamir, M. Prusikova, J. Pospisil, Die Angewandte Makromol. Chem., 190, 1991, 53.
11. H.D. Durst / G.W. Gokel, Química Orgánica Experimental
12. Anderson Guarnizo Franco, Pedro Nel Martínez Yepes, Experimentos de Química Orgánica
13. M. Consuelo Jiménez, Química Física para Ingenieros Químicos
14. Donald L. Pavia 2005, Introduction to organic laboratory techniques: a small scale approach
15. Gershon J. Shugar, Jack T. Ballinger, Linda M. Dawkins – 1996 Chemical Technicians' ready reference handbook /Diccionario de ciencias Domingo Agustín Vázquez
16. Jhon McMurray; Química Organica
17. Skoog.Holller.Nirman; Principios de Análisis Instrumental, 5ta Edición
18. Duracková, Oxidants, Antioxidants and Oxidative Stress, Springer, 2008.
19. Martínez M., Toxicidad de Xenobióticos mediada por Radicales Libres de Oxígeno, Ars Pharmaceutica, 39:1 (5-18), 1998
20. Avello M., Suwalsky M., Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular, Universidad de Concepción, 2006
21. Jan Pokorny/Nedyalka Yamishlieva/Michael Gordon; Antioxidantes de los Alimentos R.A. Larson, Naturally Occurring Antioxidants 1977

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

22. B. J. F. Hudson, Elsevier Food Antioxidants, 1990
23. Valacchi G., Davis P., Oxidants in Biology, Springer, 2008.
24. Feridoon Shabihi, Natural Antioxidants: Chemistry Health
25. Frankel EN Lipid Oxidation 1988
26. GIESE,1996;SANHUEZA Y Col, 2000
27. Meyer V., Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fourth Edition, Wiley, Germany, 2004.
28. Deinstrop E., Applied Thin-Layer Chromatography, Second Edition, Wiley-VCH, Germany, 2007.
29. Fried B., Sherma J., Thin-Layer Chromatography, Fourth Edition, Marcel Dekker Inc., USA, 1999
30. McMahon G., Analytical Instrumentation, A Guide to Laboratory Portable and Miniaturized Instuments, First Edition, Wiley, 2007.
31. Kar A., Pharmaceutical Drug Analysis, Second Edition, New Age International Publishers, New Delhi, 2005
32. Amersham Biosciences, Reversed Phase Chromatography, Edition AA, United Kingdom, 1999.
33. Quattrocchi, Abelaira, Laba, Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica, Buenos Aires, 1992.
34. Adamovics J., Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Second Edition, Marcel Dekker, USA, 1997.
35. Kromidas S., HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization, Wiley-VCH, Germany, 2006.
36. Bliesner, Validating Chromatographic Methods – A Practical Guide, Wiley-Interscience, USA, 2006.
37. Ermer and Miller, Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Wiley-VCH, Germany, 2005.
38. Huber L., Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Second Edition, Informa Healthcare, USA, 2007.
39. Eurachem Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, First Edition, 1998.
40. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Validación de Métodos Analíticos, Barcelona, 2001

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

41. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
42. United States Pharmacopeial Convention Inc, United States Pharmacopeia 32 NF-27, 2009.
43. International Union of Pure and Applied Chemistry, Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, Hungary, 1999
44. Błaszczyk, A.; Skolimowski, J. Ethoxyquin and its Derivatives 2005, 112. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 62 No. 2pp (Polish Pharmaceutical Society).
45. The Merck Index, 11th Edition

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXOS

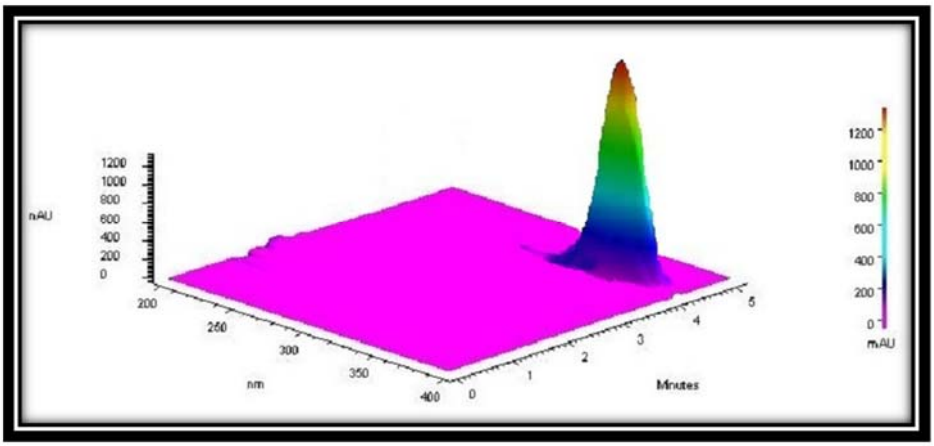
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

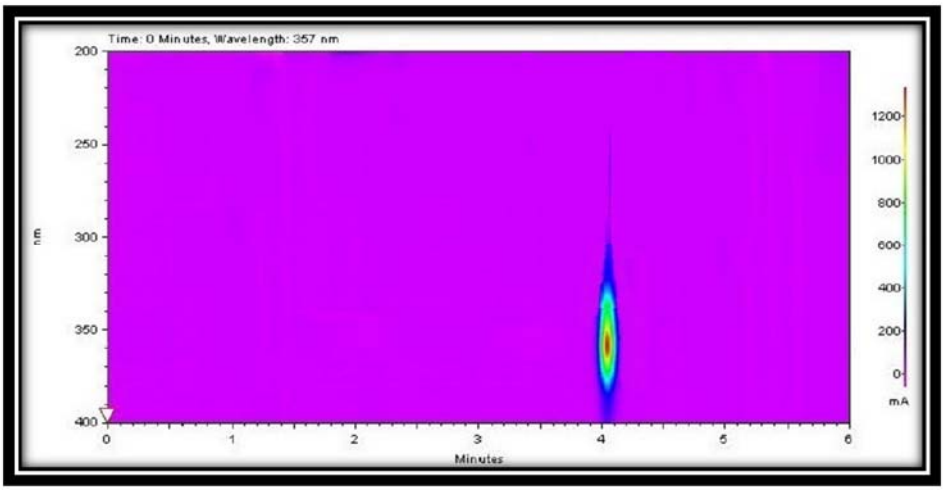
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

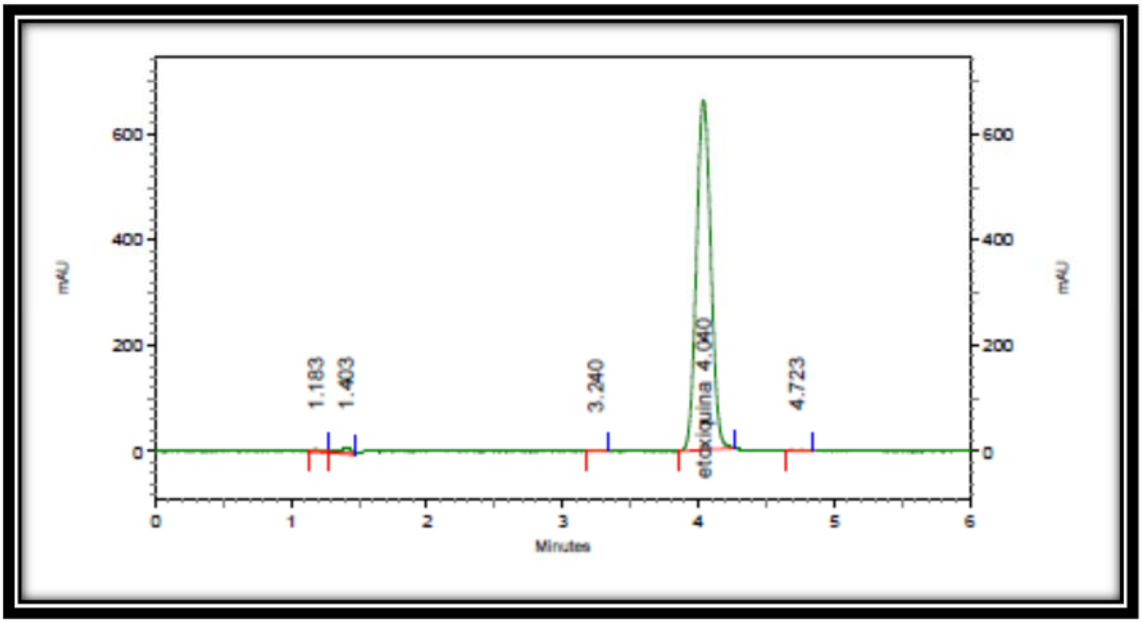
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO 1

TOPOGRAMAS Y CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR DE ETOXIQUINA







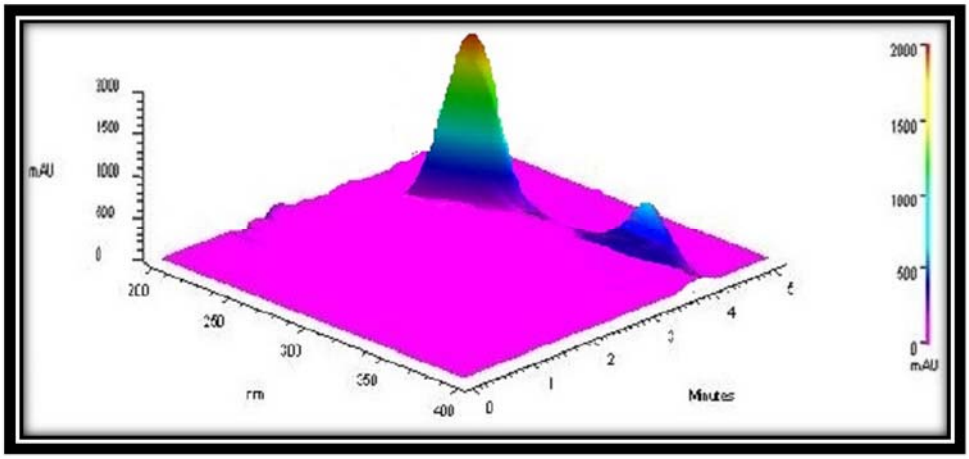
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

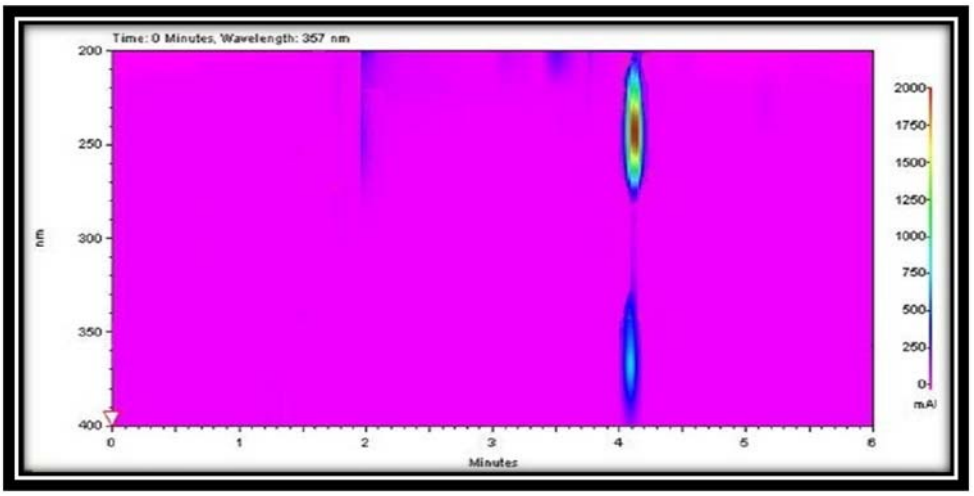
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

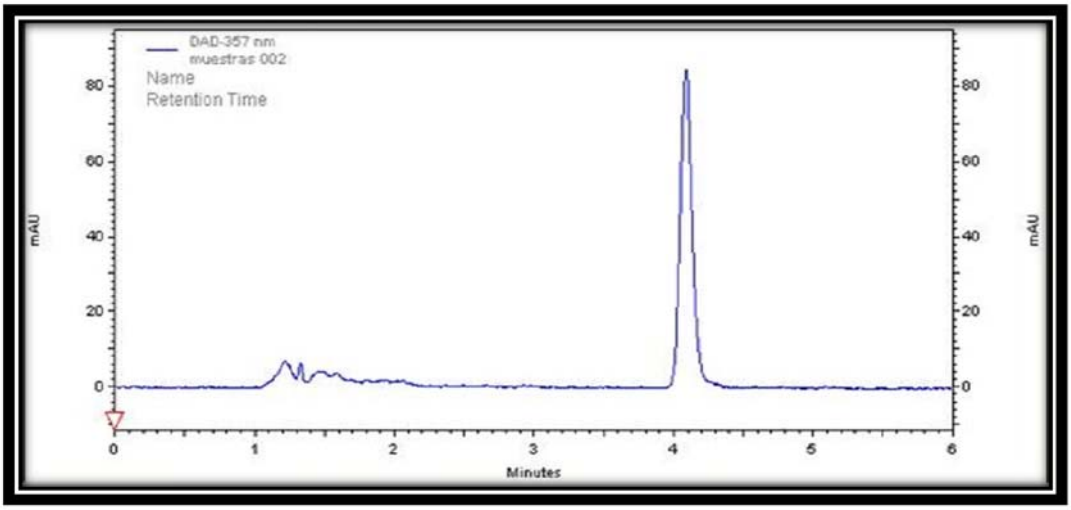
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO 2

TOPOGRAMAS Y CROMATOGRAMAS DE ETOXIQUINAPRESENTE EN MUESTRA DE HARINA DE PESCADO







Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO 3 : TABLA DE DISTRIBUCIÓN t

Value of *t* for a confidence interval of Critical value of |t| for *P* values of number of degrees of freedom	90% 0.10	95% 0.05	98% 0.02	99% 0.01
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Fuente: Miller James, Miller Jane, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Fifth Edidion.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ANEXO 4

VALORES CRITICOS DE F PARA UNA COLA (P=0.05)

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

Fuente: Miller James, Miller Jane, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Fifth Edidion.

Leyenda:

- V1 = Grados de Libertad del Numerador
- V2 = Grados de libertad del Denominador

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

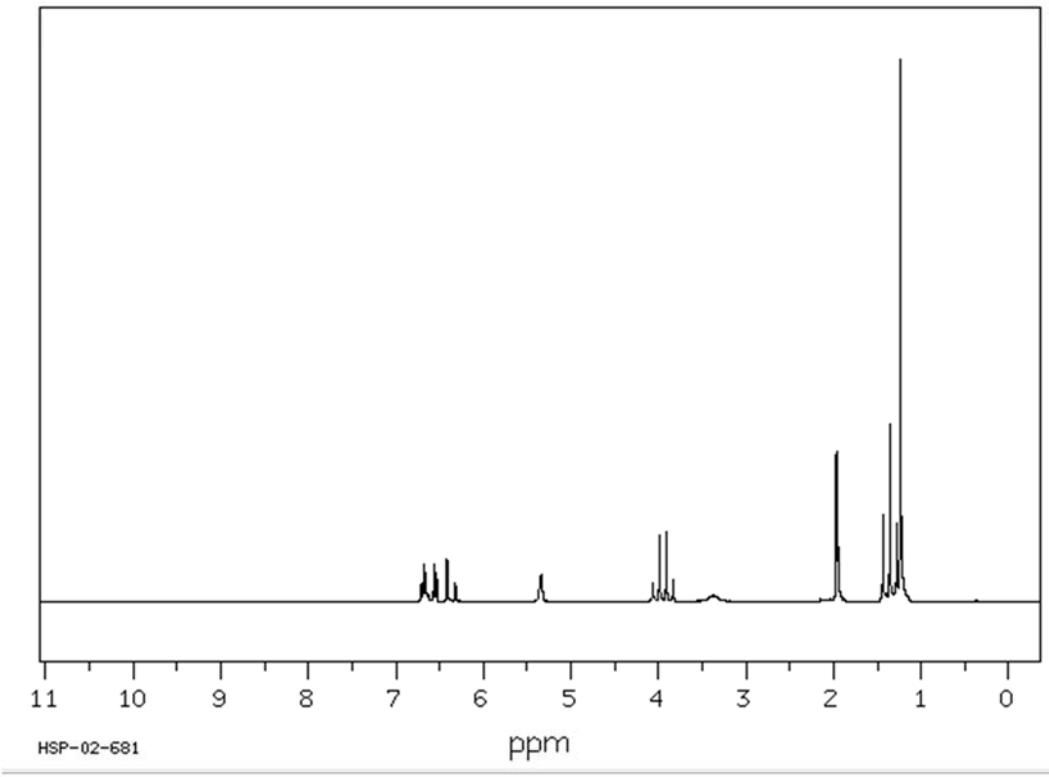
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

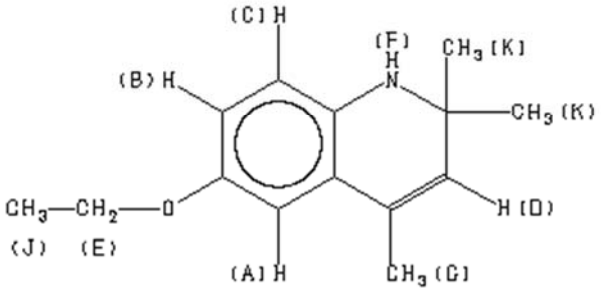
SDBS-^{1}H NMRSDBS No. 7349HSP-02-681 89.56 MHz

$C_{14}H_{19}NO$ 0.04 ml : 0.5 ml $CDCl_3$

6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline



Assign.	Shift(ppm)
A	6.687
B	6.586
C	6.386
D	5.346
E	3.946
F	3.4
G	1.961
J	1.358
K	1.236



J(D,G)=-1.5HZ. J(A,B)=2.7HZ. J(A,C)=0.7HZ.
J(B,C)=8.2HZ.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

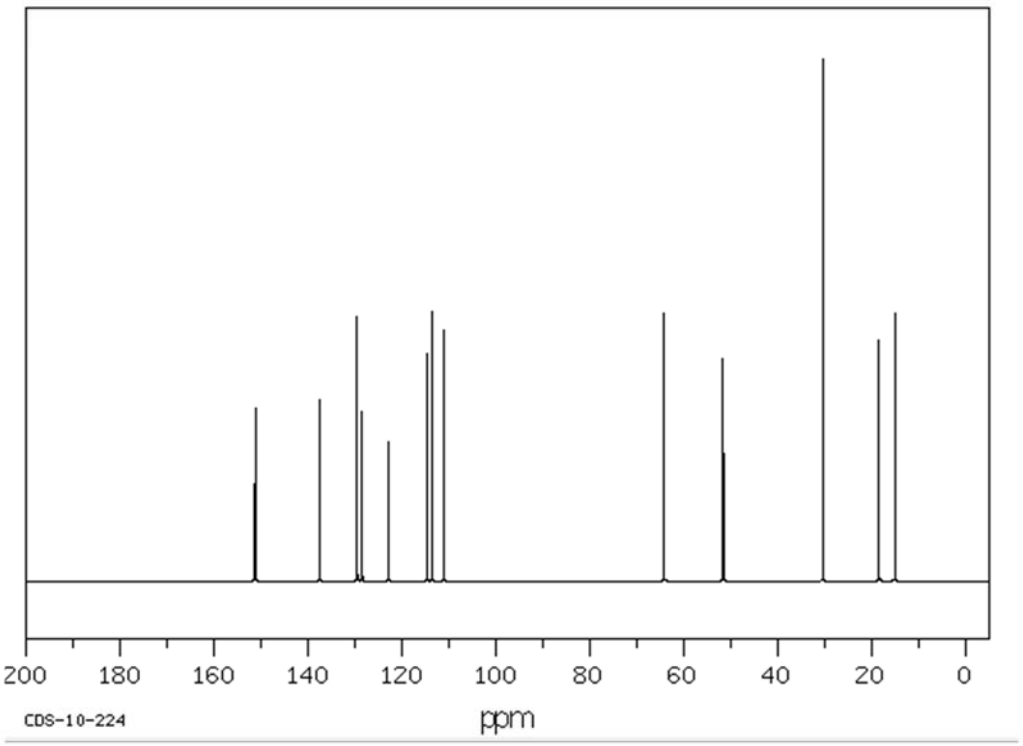
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

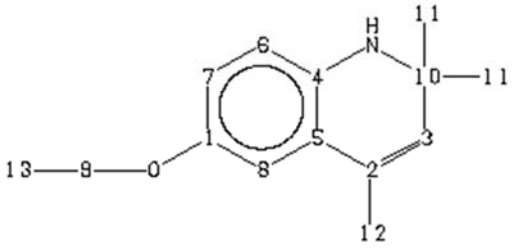
SDBS-^{13}C NMRSDBS No. 7349CDS-10-224 50.18 MHz

C_{14} H_{19} N O 0.05 ml : 0.5 ml $CDCl_3$

6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline



ppm	Int.	Assign.
151.24	329	1
137.59	346	2
129.53	506	3
128.46	325	4
122.80	267	5
114.61	437	6
113.59	518	7
111.10	480	8
64.22	512	9
51.62	427	10
30.37	1000	11
18.46	462	12
15.04	513	13



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis