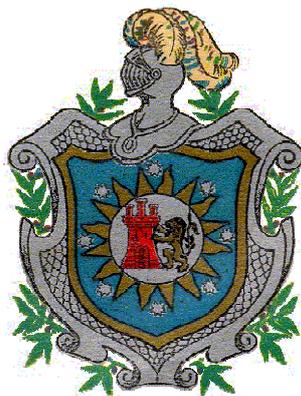


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA – LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DE  $\alpha$ -TOCOFEROL EN ACEITES  
VEGETALES COMESTIBLES POR CROMATOGRAFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE NORMAL”**

**MONOGRAFÍA**  
**PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA**

**PRESENTADA POR**

**BR. MARÍA ELENA FAJARDO ROJAS**  
**BR. CLAUDIA MERCEDES FLORES**

**TUTORES**

**DR. SERGIO JOSÉ LÓPEZ GRÍO**  
**LIC. MARÍA ERNESTINA SOTO SARRIA**

**LEÓN, NICARAGUA, AGOSTO 2008**

## *Dedicatoria*

El presente trabajo monográfico esta dedicado principalmente a nuestro señor *Jesucristo* que me ha iluminado en el camino y dado la fuerza para seguir adelante

A mi madre *Carmen Maria Flores Romero* gracias por su apoyo incondicional, amor, comprensión y dedicación asía mi persona.

Bra: *Claudia Mercedes Flores.*

## *Dedicatoria*

*El presente trabajo monográfico es dedicado a Dios por ser el motor que impulsa mi vida dándome la fuerza y la sabiduría para culminar mis estudios y realizar la presente monografía*

*A mis padres María Elena Rojas y Lino Rene Fajardo Cárdenas por que gracias a sus sacrificios consejos y apoyo tanto económico como emocional me he logrado formar tanto personal como profesionalmente*

*Bra: María Elena Fajardo Rojas.*

## Agradecimientos

Agradezco principalmente a *Dios* por darme la fuerza y la capacidad de entendimiento para lograr llevar a término el presente trabajo.

A mis padres *Maria Elena Rojas y Lino Rene Fajardo Cárdenas* por enseñarme valores que me sirvieron como persona y que me servirán como profesional por sus sacrificios al brindarme todo lo necesario para realizar mis estudios por sus palabras de aliento y por ser mi modelo a seguir.

A mi amigo y esposo *Darwin Ricardo Quiroz* por su apoyo y comprensión en los momentos difíciles.

A mis tutores *Lic. Maria Ernestina Solo Sarria y Dr. Sergio López Gris* por su paciencia, por dedicar parte de su tiempo y compartir sus conocimientos para realizar y llevar a feliz término la presente monografía.

A mi amiga y compañera de tesis *Claudia Mercedes Flores* por su esfuerzo y entusiasmo y por sus palabras de aliento en los momentos difíciles que se presentaron en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeras y amigas *Francinie Corrales y Maria Reneé Lara* por brindarme su amistad sincera a lo largo de la carrera.

Agradezco también al personal de la bodega de química *Indina Muñoz y Rafael Olivas* por estar siempre dispuestos a ayudarnos.

Bra: *Maria Elena Fajardo Rojas.*

## *Agradecimiento*

*Agradecemos principalmente a nuestro señor Jesucristo por darme la fuerza e iluminación en el presente trabajo*

*A mi madre Carmen Maria Flores Romero por brindarme todo el apoyo económico, sentimental y por darme la inspiración en seguir adelante en esta etapa de mi vida.*

*A agradezco a mis tutores Dr. Sergio López Gris y lic. Maria Ernestina Soto, por brindarme tiempo, paciencia y sobre todo por compartir momentos de sus conocimientos ante el trabajo monográfico.*

*Agradezco a mis compañeros, al personal educativo por brindarme su cariño, amistad y paciencia en esta jornada de mi vida.*

*Bra: Claudia Mercedes Flores.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Objetivos	4
IV. Marco teórico	5
IV.1. Vitaminas	5
IV.2. Aceites	12
IV.3. Antecedentes de la determinación de $\alpha$ -tocoferol	16
IV.4. Pretratamiento de muestra	18
IV.5. Cromatografía Líquida de Alta Resolución	19
IV.6. Dosis Diaria Recomendada de Vitamina E	20
IV.7 Parámetros Estadísticos	21
V. Metodología	29
V.1. Equipos	29
V.2. Materiales	29
V.3. Reactivos	30
V.4. Preparación de Soluciones	30
V.5. Métodos	32
VI. Análisis de resultados	34
VI.1. Determinación del contenido de $\alpha$ -tocoferol en las muestras diluidas y saponificadas	34
VI.2. Aporte a la dosis diaria recomendada (DDR) de $\alpha$ -tocoferol de las muestras diluidas y saponificadas	45
VI.3. Estudio de las diferencias encontradas en contenido de $\alpha$ -tocoferol en las muestras diluidas y saponificadas	46
VII. Conclusiones	57
VIII. Recomendaciones	59
IX. Bibliografía	60
X. Anexo	62

## I. RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en seis muestras de aceites vegetales comestibles, las que fueron adquiridas en el supermercado la Unión y el mercado central de la ciudad de León. Estas fueron sometidas a dos tratamientos: dilución y saponificación previo a su análisis por HPLC en Fase Normal.

Los resultados obtenidos muestran evidentes diferencias entre las muestras diluidas y saponificadas respecto a su contenido de  $\alpha$ -tocoferol, las que fueron confirmadas estadísticamente. La relación del contenido de  $\alpha$ -tocoferol en una porción de aceite demostró que su contenido es mayor que la Dosis Diaria Recomendada (DDR), pero es mucho menor que la Ingesta Máxima Diaria (IMD).

La aplicación de pruebas estadísticas como: análisis de correlación, análisis de componentes principales y análisis clasificadorio ascendente jerárquico, demostraron la existencia de similitudes entre el contenido de  $\alpha$ -tocoferol de los aceites objeto de este estudio.

Los resultados obtenidos pueden ser usados como una base para futuros estudios respecto al contenido de los isómeros de la vitamina E en muestras de aceites vegetales comestibles.

## II. INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son sustancias orgánicas, de naturaleza y composición variada, imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos, tendiendo así a una buena salud, actividad física y cotidiana.

La vitamina E participa en la formación de glóbulos rojos, músculos y otros tejidos. Es necesaria para la formación de las células sexuales masculinas y en la antiesterilización, es utilizada en tratamientos de enfermedades relacionadas con la edad, trastornos cardiovasculares o Alzheimer. La vitamina E se presenta químicamente en ocho diferentes formas isoméricas cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles siendo la forma más eficaz y extensiva el  $\alpha$ -tocoferol

La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol debe ser aportada a través de la alimentación, puesto que el cuerpo humano no puede sintetizarla., siendo una de sus fuentes principales los aceites vegetales.

Según los antecedentes bibliográficos consultados la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase normal es una técnica analítica adecuada para la eficaz separación de los isómeros de vitamina E. Esta técnica consiste en la separación de los componentes de una mezcla según su polaridad; donde el grado de retención depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y la fase móvil.

Las fuerzas de interacciones no solo dependen de los grupos funcionales del compuesto de interés si no también de los factores estéricos, de forma tal que los isómeros estructurales pueden ser diferenciados el uno del otro. El tiempo de retención se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

Conociendo que unas de las fuentes principales de vitamina E son los aceite vegetal el presente trabajo pretende presentar los aporte de  $\alpha$ -tocoferol de seis muestra de aceite vegetales de composición diferente utilizando la técnica de Cromatografía Liquida de Alta Resolución en modo de Fase Normal siendo la que nos produjo mejores resultados para la identificación y la cuantificación

### **III. OBJETIVOS**

#### **II.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el contenido de  $\alpha$ -Tocoferol en aceites comestibles vegetales mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Normal (HPLC-NP).

#### **II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el contenido de  $\alpha$ -Tocoferol en muestras de aceite vegetal comestible de las marcas Crisco, Girol, Clover, Mazola, Regia y Sabemas usando dos Pretratamiento de muestras.

Determinar el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en las muestras de aceites Crisco, Girol, Clover, Mazola, Regia y Sabemas analizadas utilizando un modelo de regresión lineal simple.

Establecer el aporte nutricional de vitamina E de las muestras analizadas a la dosis diaria recomendada (DDR).

Aplicar técnicas de análisis estadístico a los resultados obtenidos para determinar tendencias entre las muestras analizadas.

## IV. MARCO TEÓRICO

### IV.1 Vitaminas

Las **vitaminas**, del latín *vita* (vida) y del griego *ammoniakós* (producto libio, amoníaco) con el sufijo latino *ina* (sustancia), son compuestos heterogéneos que no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo que éste no puede obtenerlos más que a través de la ingestión directa. Las vitaminas son **nutrientes esenciales**, imprescindibles para la vida, la salud, actividad física y cotidiana. [1]

Las vitaminas no producen energía y por tanto no implican calorías. Intervienen como catalizadores en las reacciones bioquímicas provocando la liberación de energía. En otras palabras, la función de las vitaminas es la de facilitar la transformación que siguen los sustratos a través de las vías metabólicas [2] y actuar como grupos prostéticos de las enzimas. Sus requerimientos no son muy altos, pero tanto su defecto como su exceso pueden producir enfermedades (respectivamente, avitaminosis e hipervitaminosis). [1]

#### IV.1.1 Clasificación de vitaminas

Químicamente, todas las vitaminas son diferentes, pero, de acuerdo a su solubilidad, se clasifican en: hidrosolubles (las que se diluyen en agua) y liposolubles (las que se diluyen en grasas) [4]. En la tabla siguiente se encuentran las vitaminas clasificadas según su solubilidad y las fuentes alimenticias, sus funciones principales y los defectos que puede causar su deficiencia en el organismo.

**Tabla IV.1.** Las vitaminas se dividen en dos grandes grupos [1]:

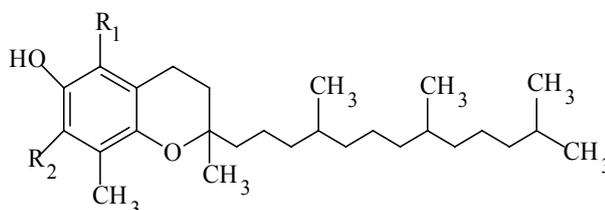
<i>Vitamina</i>	<i>Alimentos en los que se encuentra</i>	<i>Funciones principales</i>	<i>Efectos de la deficiencia</i>
<b><i>Liposoluble</i></b>			
A (Retinol)	Vegetales, productos lácteos ,hígado	Componentes de pigmentos sensibles a la luz. Afecta a la vista y al mantenimiento de la piel	Ceguera nocturna, ceguera permanente, sequedad en la piel
D(Calciferol)	Productos lácteos, huevo, aceite de hígado de pescado	Absorción de calcio, formación de huesos	Raquitismo
E (Tocoferol)	Margarina, semilla, verduras de hoja verde	Protege contra la oxidación de ácidos grasos y membranas celulares	Anemia
K(Fitonadiona)	Verduras de hojas verdes	Coagulador sanguíneo	Inhibición de la coagulación de la sangre
<b><i>Hidrosoluble</i></b>			
C (Ácido ascórbico)	Cítricos, verdura de hojas verdes, tomates	Formación de colágeno en dientes, huesos y tejido conectivo de vasos sanguíneos	Escorbuto (hemorragia y caída de dientes)
B <sub>1</sub> (Tiamina )	Vísceras, cerdo, cereales, legumbres	Es parte de una coenzima que descompone y asimila los carbohidratos. Es esencial para los ácidos nucleicos, el ADN y el ARN, los portadores de los genes. Promueve el apetito y normaliza las funciones del sistema nervioso	Beriberi (debilidad muscular, mala coordinación e insuficiencia cardiaca), crecimiento retardado, deterioro de tejidos, depresión, hinchazón de los tejidos debido a la retención de líquidos
B <sub>2</sub> (Riboflavina)	Productos lácteos, cereales, huevos, hígado, legumbres	Permiten que las células usen el oxígeno. Es importante para la vista y la piel	Irritación ocular, inflamación y ruptura de células epidérmicas

B <sub>3</sub> (Nicotinamida)	Hígado, cereales, Carne magra, legumbres	Permite que el cuerpo forme grasas, que las células absorban oxígeno, liberen dióxido de carbono y obtengan energía mediante la combustión de carbohidratos. Es importante para la piel, los nervios y órganos que intervienen en la digestión.	Pelagra (dermatitis, diarrea, y trastornos mentales), llagas en la piel y en el conducto gastrointestinal, pérdida del apetito, debilidad, irritabilidad, mareos
B <sub>5</sub> (Ácido pantoténico)	Productos lácteos, cereales, huevos, hígado, legumbres	Metabolismo	Fatiga, pérdida de coordinación
B <sub>6</sub> (Piridoxina)	Cereales, verduras, carne	Promueve el metabolismo de grasa y proteína e interviene en la transformación del aminoácido triptófano en niacina	Convulsiones, irritabilidad, problema de la piel alrededor de los ojos, cálculo en el riñón, anemia
B <sub>12</sub> (Cobalamina)	Carne roja, huevos, productos lácteos	Ayuda a formar ácidos nucleicos, contribuye al funcionamiento normal de los glóbulos rojos y ayuda a mantener las células nerviosas	Temblores involuntarios, pérdida de peso y del apetito, ardor en la lengua, fatiga, alteraciones del sistema nervioso, anemia perniciosa
B <sub>8</sub> (Biotina)	Carne, verduras y legumbres.	Es producida por bacterias intestinales. Ayuda a formar glóbulos sanguíneos, metaboliza ácidos grasos y aminoácidos y es importante para la piel	Depresión, fatiga y náuseas
B <sub>9</sub> (Ácido fólico)	Alimentos integrales, verdura de hoja verde, legumbres.	Metabolismo de los ácidos nucleicos, promueve el metabolismo de la proteína y la formación de glóbulos rojos.	Enrojecimiento de la lengua, diarrea, fatiga, debilidad

#### IV.1.2 Definición Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)

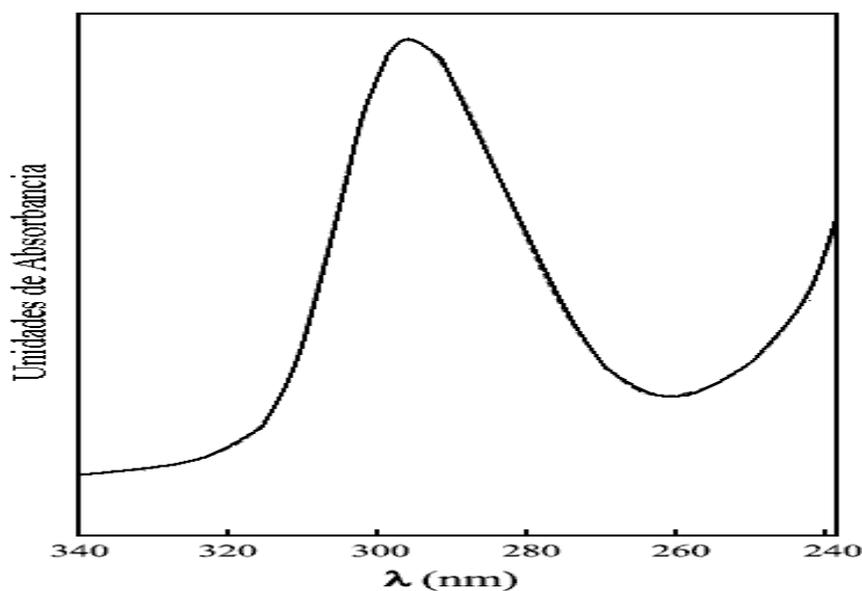
Es una vitamina liposoluble esencial para el organismo, con propiedades antioxidantes que ayuda a proteger los ácidos grasos [4]. Químicamente, se presenta en ocho diferentes formas isoméricas, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles.

Todos los isómeros tienen anillos aromáticos (ver Fig. III.1) con un grupo hidroxilo el cual puede donar un átomo de hidrógeno para reducir los radicales libres de los materiales que componen las membranas biológicas hidrófugas de las paredes de las células. Existen formas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ) para ambas formas isoméricas, y se determina por el número de grupos metílicos en el anillo cromático. Cada forma tiene su actividad biológica propia. La forma más eficaz de la vitamina E es la  $\alpha$ -tocoferol [5]. La figura III.2 muestra el espectro de absorción del isómero  $\alpha$ -tocoferol, el cual sirve para la determinación de este isómero [6].



Grupo sustituyente	$\alpha$	$\beta$	$\delta$	$\gamma$
R <sub>1</sub> :	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
R <sub>2</sub> :	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>	-H

*Figura IV.1* Estructura base del Tocoferol



**Figura IV.2.** Espectro de absorción en el UV del isómero  $\alpha$ -tocoferol.

#### **IV.1.2.1. Características de la vitamina E**

La vitamina E es considerada la vitamina del corazón, dado que es preciso tener las necesidades de esta vitamina cubiertas para tener un corazón saludable. La razón se encuentra en su capacidad de protección de las membranas de las células a las que impide que los radicales libres las oxiden, lo cual llevaría a una degradación del cuerpo humano, especialmente a la aparición de enfermedades cardíacas o posibles cánceres. Es una vitamina, que junto con la vitamina A y la C, forma el grupo de las vitaminas antioxidantes. [7]

#### **IV.1.2.2. Propiedades.**

Propiedades antioxidantes: Es un componente antioxidante que favorece la eliminación de los radicales libres y evita el enranciamiento de las grasas. La capacidad de esta vitamina para proteger las membranas celulares e impedir su oxidación es la responsable de sus poderes preventivos en muchas enfermedades degenerativas que van apareciendo poco a poco a medida que las personas se hacen mayores. Así, se ha comprobado como dosis de unas 300 UI

diarias protegen a los hombres - no a las mujeres - del cáncer de colon y a las mujeres del cáncer de pecho y de cuello de útero. Dosis superiores de hasta 2000 UI diarias retrasan la degeneración mental que produce el Alzheimer u otras formas de demencia. Igualmente parece tener un papel positivo en el tratamiento del Parkinson cuando se combina con seligilina. La vitamina E parece ser uno de los mejores antídotos para conseguir mantenerse jóvenes durante más tiempo. [7]

**Propiedades oculares:** se cree que la vitamina E entre otros antioxidantes pueden prevenir o retrasar la formación de cataratas y mejor la visión. [7]

**Propiedades cicatrizantes:** la vitamina E es importante en la formación de fibras elásticas y colágenas del tejido conjuntivo. Promueve la cicatrización de quemaduras [4]

#### **IV.1.2.3.Funciones:**

1. De acuerdo a su propiedad antioxidante la vitamina E protege a los tejidos de los efectos nocivos de las toxinas ambientales y del daño consecuente a los procesos metabólicos normales, contribuyendo a prevenir el envejecimiento de células y tejidos, y algunas formas de cáncer.
2. Cumple un rol importante en cuanto al mantenimiento del sistema inmune saludable, especialmente durante el stress oxidativo y enfermedades virales crónicas. Induce la proliferación de células de defensa y aumenta la respuesta celular ante algún daño o infección
3. La vitamina E es esencial en el mantenimiento de la integridad y estabilidad de la membrana axonal (membrana de las neuronas).
4. Evita la formación de trombos que hacen difícil la circulación en los vasos sanguíneos. Por ellos evitan o disminuye el riesgo de padecer un infarto de miocardio, angina de pecho o embolias. Previene la aparición de calambres en las piernas en aquellas personas con mala

circulación. La vitamina E puede prevenir o retrasar enfermedades cardíacas al limitar la oxidación del LDL colesterol o colesterol malo.

5. Indispensable para la maduración normal del espermatozoide y el normal funcionamiento de la placenta, también interviene en la formación del óvulo.
  
6. La vitamina E ayuda a proteger las membranas celulares del daño que producen los radicales libres, el cual puede conducir al desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer. [4]

#### **IV.1.2.4.Principales fuentes naturales de vitamina E**

La vitamina  $\alpha$ -tocoferol se encuentra principalmente en:

- Yema de huevo.
- Aceites vegetales germinales (soja, cacahuete, arroz, algodón y coco).
- Vegetales de hojas verdes
- Cereales
- Panes integrales

No son habituales los excesos ni defectos de esta vitamina en el organismo si su consumo tiende a ser proporcional al de grasos poliinsaturados. Dado que su presencia elimina sustancias tóxicas, ayuda a remover las ingresadas al organismo por los fumadores. [4]

#### **IV.1.2.6. Deficiencia de vitamina E.**

Rara vez existe carencia de vitamina E. Si esto sucede se manifiesta en casos específicos. Se distinguen principalmente estas tres situaciones:

- Individuos que tienen dificultad para absorber grasa o secretar bilis o que padezcan de algún desorden en el metabolismo de las grasas (enfermedad celiaca y fibrosis cística)
  - Bebes prematuros ( con muy bajo peso al nacer) que pesan menos de 1500 gramos
  - Individuos con anormalidades genéticas en las proteínas trasportadoras del  $\alpha$ -tocoferol
- Así mismo los niveles de vitamina E pueden descender debido a una insuficiencia de zinc.

Síntomas de la deficiencia de vitamina E

- Irritabilidad
- Retención de líquidos
- Anemia hemolítica (destrucción de glóbulos rojos)
- Alteraciones oculares
- Daño en el sistema nervioso
- Dificultad para mantener el equilibrio
- Cansancio, apatía
- Incapacidad para concentrarse
- Alteraciones en la marcha
- Respuesta inmune disminuida [4]

#### **IV.1.2.7. Toxicidad.**

La vitamina E es considerada segura aún si las dosis son grandes. Dosis mayores a 800 UI pueden traer consecuencias como:

- Diarrea
- Dolor abdominal
- Fatiga
- Disminución de la resistencia frente a infecciones bacterianas
- Sangrado (debido que la vitamina E tiene efecto anticoagulante)
- Hipertensión arterial
- Disminución de la vitamina C en la sangre [4]

## **IV.2. ACEITES**

La palabra aceite (del árabe *az-zait*, el jugo de la aceituna, y éste del arameo *zayta*) es un término genérico para designar numerosos líquidos grasos de orígenes diversos que no se disuelven en el agua y que tienen menos densidad que ésta. Es sinónimo de *óleo*, del latín *oleum*, pero este término se emplea sólo para los sacramentos de la Iglesia Católica y en el arte de la pintura.

**IV.2.1. Los aceites se dividen en:****IV.2.1.1. Aceites comestibles.**

Los aceites comestibles provienen tanto del reino animal como del vegetal. Una manera de determinarlos químicamente se centra principalmente en extraer el aceite de la planta usando éter petróleo y metanol a reflujo y luego aplicar una vez purificado una cromatografía en fase vapor y con esto observar la proporción de ácidos grasos presentes en este aceite.

En general los aceites vegetales aportan ácidos grasos insaturados y son ricos en vitamina E. Su valor energético es de 900 Kcal. por cada 100 g.

**IV.2.1.2. Aceites minerales.**

Se utiliza esta denominación para aceites obtenidos por refinado del petróleo y cuyo uso es el de lubricantes. Su uso es extensivo en la industria metalmeccánica y automotriz. Estos aceites se destacan por su viscosidad, capacidad de lubricación frente a la temperatura y capacidad de disipar calor, como el caso de los aceites térmicos (Ejemplo: Downterm).

**IV.2.1.3. Aceites combustibles.**

Los aceites combustibles son una variedad de mezclas líquidas de color amarillento a pardo claro provenientes del petróleo crudo, o de sustancias vegetales (biodiesel/biocombustibles). Ciertas sustancias químicas que se encuentran en ellos pueden evaporarse fácilmente, en tanto otras pueden disolverse más fácilmente en agua.

**IV.2.2. Características químicas de los aceites vegetales.**

Los aceites, así como las grasas, son triglicéridos de glicerol (también llamado «1, 2,3 propanotriol» o sólo propanotriol). El glicerol es capaz de enlazar tres radicales de ácidos grasos llamados carboxilatos. Dichos radicales grasos por lo general son distintos entre sí; pueden ser saturados o insaturados, a la molécula se le llama triglicéridos de propanotriol. Los

radicales grasos pueden ser desde 12 carbonos de cadena hasta 22 y 24 carbonos de extensión de cadena. Existen en la naturaleza al menos 50 ácidos grasos.

Los aceites insaturados, son susceptibles de ser hidrogenados para producir mantecas hidrogenadas industriales de determinado grado de insaturación o índice de Yodo, que se destinan para margarinas y mantecas de repostería. Unos aceites de gran importancia son el omega 3 y el omega 6 que son poliinsaturados muy abundantes en peces de aguas heladas.

#### **IV.2.3. Clasificación de los aceites comestibles.**

Dentro de la clasificación pueden distinguirse dos tipos de aceite, los vírgenes y los refinados. Los primeros son los extraídos mediante "prensado en frío" (no más de 27 °C), conservando el sabor de la fruta o semilla de la que son extraídos.

Los aceites refinados son aquellos que se someten a un proceso (refinado) y desodorizado lo que permite obtener un aceite que responde a ciertos criterios: organolépticamente es de un sabor neutro, visualmente está limpio y con un color adecuado, y además es seguro alimentariamente y permite una mejor conservación. Esta técnica suele utilizarse para modificar aceites que no son aptos para el consumo humano (aceite lampate, extraído del bagazo de la oliva) o para poder aumentar la producción de determinados productos que si fuesen sometidos a una simple presión en frío para obtener un aceite virgen no resultarían rentables económicamente (semillas de girasol).

Suelen utilizarse mezclas de aceites vírgenes y refinados para aportar sabor y color. El caso más habitual es el del aceite de oliva. En el caso del aceite de girasol es extraño que se mezcle por lo cual el producto comercializado es insulso.

Muchas margarinas y mantecas hidrogenadas llevan en su formulación aceites no sólo con el objeto de dar un aporte organoléptico, sino también para controlar su curva de sólidos (que es la que determina cuándo estará líquida y cuándo sólida en función de la temperatura). [6]

Los aceites vegetales se pueden extraer mediante distintos métodos los cuales se explican a continuación.

#### **IV.2.4. Elaboración del Aceite Vegetal.**

Los aceites vegetales pueden ser elaborados por dos tipos de métodos:

**Irrefinado:** proceso de extracción (mecánica o por solvente) y posterior filtrado, para eliminar las impurezas, donde no tiene lugar ningún proceso de refinado adicional. Esto garantiza la mejor calidad del producto y hace del aceite el más exquisito para la alimentación y la preparación cosmética. El proceso de irrefinado ayuda a que el aceite retenga un rico y fuerte sabor, aroma y color y muchos de los nutrientes naturales que contiene.

**Refinado:** para extender la vida útil del aceite, algunos fabricantes refinan los aceites. El refinado puede incluir hasta 40 pasos diferentes: la exposición a temperaturas extremas, tanto a desodorización a altas temperaturas (232°C - 450 Fahrenheit) como a hibernación a bajas temperaturas (0°C - 32°F), la desgomación. Los aceites refinados también pueden ser extraídos con el uso de disolventes y otros productos químicos.

##### **IV.2.4.1. Métodos de Extracción.**

**Centrifugado.** Las materias, generalmente tras ser prensadas, se separan por una centrifugadora en sólidos, aceite y agua. Es el opuesto a la decantación natural o de reposo.

**Prensa de Expulsor.** Es un extractor mecánico continuo (opuesto a por lotes), donde el aceite se exprime de la materia prima en un solo paso, bajo alta presión. El expulsor de aceite es un tornillo de alta presión usado para extraer aceites de semilla y cáscaras, como las semillas de eucalipto, semilla de algodón, salvado de arroz, té y habas, semillas de colza (*rapessed*) y de canola; semilla de algodón etc.

#### **IV.2.5. Aceites de Semillas**

Son aquellos que proceden de frutos o semillas en condiciones que permiten obtener un producto bromatológicamente aceptable, obtenidos por extracción por procesos físicos, mediante acción mecánica o disolución por disolventes

Los aceites vegetales de semillas no pueden destinarse al consumo si previamente no han sido sometidos a un proceso de refinación.

Los aceites vegetales de semillas se pueden comercializar bajo el nombre de la semilla de la cual proceden, siendo los más comercializados en nuestro país los de:

- Girasol
- Soja
- Germen de maíz

O bajo el nombre de aceite de semillas cuando esté constituido por la mezcla de dos o más aceites procedentes de las semillas antes mencionadas. [8]

### **IV. 3 Antecedentes de la determinación de $\alpha$ -tocoferol**

Previo a la determinación del contenido del isómero más activo de la vitamina E en las muestras objeto de estudio, se realizó la revisión bibliográfica para obtener datos de referencia que sirvieran de guía para la obtención de resultados aceptables a los objetivos planteados. De esta forma, se presenta un resumen de los principales estudios llevados a cabo según la técnica analítica usada y el proceso de tratamiento de las muestras analizadas (Ver tabla IV.2).

A partir de esta información, y de las pruebas experimentales realizadas en el Laboratorio de Técnicas de Separación, se decidió comparar dos procedimientos de extracción usando la técnica de análisis Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Normal (HPLC-NP).

**Tabla IV.2 Revisión bibliográfica.**

Título	Autor	Técnica	Tratamiento de las muestras
Estudio simultáneo por cromatografía líquida de retinol, $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -carotenos, $\alpha$ -caroteno, licopeno y $\beta$ -criptoxantina en plasma con acetato de tocoferol como estándar interno.	DI Thurnham, E Smith y PS Flora	HPLC-RP	Dilución
Concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en ratas como respuesta a la suplementación con aceite vegetal de diferentes fuentes	C M Baracaldo, E Poveda, E Ordóñez, M Rodríguez, P Ayala, W Delgado, M Guerra	HPLC-RP	Micro-saponificación
Determinación simultánea de tocoferol, carotenoides y clorofilas para el monitoreo de sus efectos en la oxidación del aceite de oliva virgen.	E Psomiadou y M Tsimidou	HPLC-NP	–
Determinación de $\alpha$ -tocoferol en preparado de cápsula de aceite de espina de mar en la medicina tradicional china por HPLC-RP	Z Luhua, T Ying, Z Zhengyu y W Guangji	HPLC-RP	Saponificación
Determinación de acetato de DL-tocoferol y DL-tocoferol en alimentos por HPLC usando reacción fotoquímica post-columna	T Hisaya y T Yukio	HPLC-NP	–
Método de cromatografía líquida en fase reversa para la determinación de tocoferoles	G Swigo, A Sikorska, E.	HPLC -RP	–
Desarrollo y validación del método de HPLC para la determinación de $\alpha$ -tocoferol en eritrocitos humanos para la aplicación clínica	D Solichová, L Korecká, I Svobodová, F Musil, V Bláha, P Zdánský, Z Zadák.	HPLC-RP	Dilución
Determinación de tocoferoles y tocotrienoles en grasa y aceites vegetales por cromatografía líquida de alta Resolución	W. D. Pocklington, A. Dieffenbacher	HPLC-NP	Saponificación

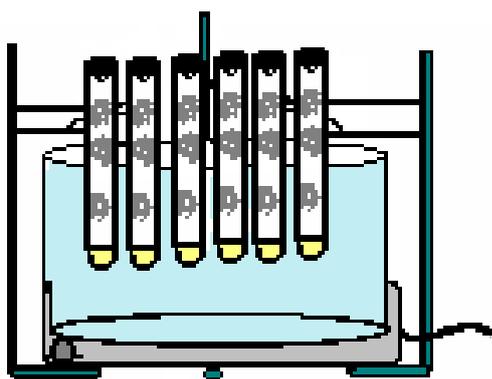
## IV.4 Pretratamiento de la Muestra

### Muestreo

#### IV.4.1 Saponificación

El procedimiento más común para la determinación de tocoferoles incluye la saponificación alcalina de las muestras seguida por la extracción del material no saponificable con un solvente orgánico apropiado. Cualquier éster de  $\alpha$ -tocoferol que pueda haberse agregado como un suplemento a los alimentos será convertido a  $\alpha$ -tocoferol por este procedimiento.

Los tocoferoles son extraídos de la mezcla de saponificación por medio de un solvente adecuado, por ejemplo, éter dietílico, tertbutil metil éter, n-hexano, 3 a 4 veces con volúmenes que fluctúan.



*Figura IV.3.* Esquema del equipo usado para la microsaponificación

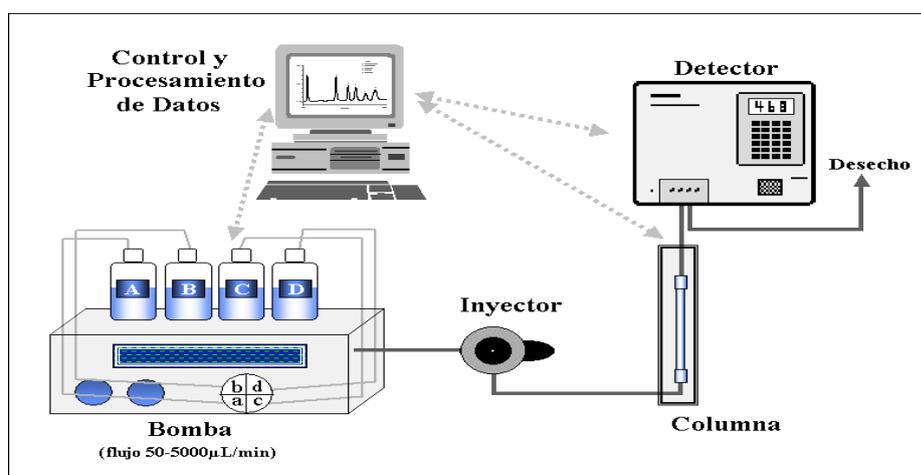
#### IV. 4.2 Dilución

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol por el procedimiento de dilución se utilizó como solvente n-hexano, debido a la alta solubilidad que presentan tanto los aceites analizados como el analito.

## IV.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La **Cromatografía Líquida de Alta Resolución** (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo



**Figura IV.4 Esquema general del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución**  
[16]**IV.5.1. Cromatografía de fase normal**

La cromatografía de fase normal o "Normal phase HPLC" (NP-HPLC) fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención. [9]

**IV.6. Dosis diaria recomendada de vitamina E**

Las recomendaciones específicas para cada vitamina dependen de la edad, el sexo y otros factores (como el embarazo). El Comité de Nutrición y Alimentos del Instituto de Medicina (*universidad de Boston Ma. Estados Unidos*) dio a conocer los siguientes consumos de referencia en la dieta para la vitamina

En la siguiente tabla se exponen los valores de la ingesta diaria recomendada de vitamina E según el Departamento de Nutrición del IOM (Institute of Medicine: Instituto de Medicina) tanto para infantes, niños y adultos. [4]

**Tabla IV.3.** Dosis diaria recomendada de vitamina E. [3]

Edad (años)	Infantes (mg/día)	Niños (mg/día)	Hombres/Mujeres (mg/día)	Embarazo (mg/día)	Lactancia (mg/día)
0 a 6 meses	4				
7 a 12 meses	5				
1 a 3		6			
4 a 8		7			
9 a 13			11		
> 14			15	15	19

**Tabla IV.4.** Ingesta máximas tolerables de vitamina E. [3]

Edad (años)	Hombres/mujeres (mg/día)	Embarazo(mg/día)	Lactancia (mg/día)
1-3	200		
4-8	300		
9-13	600		
14-18		800	
19-70		1000	
+70		1000	

## IV. 7. Parámetros estadísticos

### IV.7.1. Incertidumbre de las predicciones

Cuando se hace uso de la recta de regresión obtenida con  $n$  puntos para predecir un valor  $x_I$  a partir de la media de  $m$  réplicas o lecturas experimentales de  $y_I$ , la varianza de la predicción  $s_I^2$  viene dada por:

$$s_I = \sqrt{\frac{s_e^2}{b_1^2} \left[ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} \frac{(y_I - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

Donde,

$s_e^2$  es la varianza de los residuos,  $b_I^2$  es la pendiente al cuadrado de la recta,  $m$  son las lecturas de la muestra,  $n$  son los puntos de la recta de regresión,  $Y_I$  la media de las lecturas de la muestra,  $Y$  es la media de las lecturas de recta de regresión,  $X_i$  las concentraciones individuales de la recta de regresión y  $X$  es la media de las concentraciones de la recta de regresión.  $S_e^2$  se calcula como:

$$s_e^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}$$

Donde  $\hat{y}$  es la predicción de las lecturas de la recta de regresión.

Los límites de confianza de  $x_I$  se calculan mediante la expresión

$$x_I \pm \frac{t_{(0.05, (n+m-3))} S_I}{m}$$

Donde  $X_I$  es el valor del porcentaje de analito,  $t$  es la  $t$  de student a 95% de confianza y  $m+n-3$  grados de libertad y  $S_I$  es la desviación estándar de la predicción [10]

#### IV.7.2. Diagramas de cajas

Un diagrama de cajas o de cajas con bigotes, es una representación grafica de los descriptores no paramétricos, que se construye de la forma siguiente:

- a) Se dibuja una caja cuyos lados inferiores y superiores coinciden con los cuartiles inferiores y superiores.
- b) La caja se parte en dos por el valor que corresponde a la mediana.

- c) A cada lado de la caja se le dibuja los bigotes que corresponden a los valores extremos de la serie que pueden considerarse todavía normales y que son los que alejan del cuartil más próximo en 1,5 veces el recorrido intercuartílico, como máximo.
- d) Los valores extremos que quedan más allá de los bigotes se consideran como anómalos o atípicos y se representa como puntos aislados.

Los diagramas de caja son muy útiles para comparar la variabilidad entre series pequeñas de datos [15].

### IV.7.3. Ensayo de Dixon

El ensayo no paramétrico de Dixon esta indicado cuando las muestra tiene menos de 10 datos. Se calcula el estadístico: si

Donde,

$X^*$  es el valor sospechoso  $X_p$  es el valor más próximo al dato sospechoso, y  $X_1$ el más lejano .El dato sospechoso se rechaza cuando la distancia al dato más próximo es excesivamente grande en comparación con la distancia al lado más lejano. Para tomar la decisión  $Q_0$  se compara con el valor crítico  $Q_c$  que se toma de la tabla de Dixon de dos lados, para n datos (incluyendo el dato anómalo), y para un nivel de significación dado  $\alpha_c$ . El dato sospechoso se rechaza si el  $|Q_0|$  es mayor que  $Q_c$  [10]

### IV.7.4. Prueba de Bartlett

La prueba de Bartlett (1937) es quizá la técnica ampliamente usada para probar si las varianzas de las muestras son iguales, esto se denomina homogeneidad de varianzas En esta prueba los  $n_i$  en cada valor de X no necesitan ser iguales; sin embargo se recomienda que los  $n_i$  no sean menores que 3 muchos de los  $n_i$  deben ser mayores de 5.

La prueba de Bartlett se define como.

$$C = 1 + \frac{1}{3(t-1)} \left[ \sum \frac{1}{n_i-1} - \frac{1}{\sum(n_i-1)} \right]$$
$$S^2 = \frac{\sum(n_i-1)S_i^2}{\sum(n_i-1)}$$

$$\chi^2 = \frac{\sum(n_i - 1)\text{Ln}(S^2) - \sum(n_i - 1)\text{Ln}(S_i^2)}{C}$$

Donde:

$S^2$ : varianza conjunta o promedio,  $(n_i-1)$  son los grados de libertad,  $S_i^2$  son las varianzas  $C$ : es el factor corrector,  $\text{Ln}$  indica el logaritmo natural,  $t$ : es el número de series,  $\chi^2$ : es el estadístico utilizado para la comparación de varianzas en el test de Bartlett [11].

#### IV.7.5. ANOVA de un factor

En estadística, **análisis de varianza (ANOVA)**, según terminología inglesa) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

El ANOVA se basa en la descomposición de la variación total de los datos con respecto a la media global (SCT), que bajo el supuesto de que  $H_0$  es cierta es una estimación de obtenida a partir de toda la información maestra, en dos partes:

- Variación dentro de las muestras (SCD) o Intra-grupos, cuantifica la dispersión de los valores de cada muestra con respecto a sus correspondientes medias.
- Variación entre muestras (SCE) o Inter-grupos, cuantifica la dispersión de las medias de las muestras con respecto a la media global.

Las expresiones para el cálculo de los elementos que intervienen en el ANOVA son las siguientes:

$$\text{Media Global: } \bar{X} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}}{n}$$

$$\text{Variación Total: } SCT = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$$

$$\text{Variación Intra-grupos: } SCD = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$$

$$\text{Variación Inter-grupos: } SCE = \sum_{j=1}^k (\bar{X}_j - \bar{X})^2 n_j$$

Siendo  $x_{ij}$  el  $i$ -ésimo valor de la muestra  $j$ -ésima;  $n_j$  el tamaño de dicha muestra y  $\bar{x}_j$  su media. Cuando la hipótesis nula es cierta SCE/K-1 y SCD/N-K son dos estimadores insesgados de la varianza poblacional y el cociente entre ambos se distribuye según una F de Snedecor con K-1 grados de libertad en el numerador y N-K grados de libertad en el denominador. Por lo tanto, si  $H_0$  es cierta es de esperar que el cociente entre ambas estimaciones será aproximadamente igual a 1, de forma que se rechazará  $H_0$  si dicho cociente difiere significativamente de 1. [12]

#### IV.7.6. Correlación.

El **coeficiente de correlación de Pearson** es un índice estadístico que mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas. A diferencia de la covarianza, la correlación de Pearson es independiente de la escala de medida de las variables.

$$S_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n}$$

Donde:

$x_i$  y  $y_i$  Son las variables para  $n$  datos que intervienen en el estudio.

El valor del índice de correlación varía en el intervalo [-1, +1]:

- Si  $S_{xy} = 0$ , no existe ninguna correlación. El índice indica, por tanto, una independencia total entre las dos variables, es decir, que la variación de una de ellas no influye en absoluto en el valor que pueda tomar la otra.
- Si  $S_{xy} = 1$ , existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en idéntica proporción.
- Si  $0 < S_{xy} < 1$ , existe una correlación positiva.
- Si  $S_{xy} = -1$ , existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada *relación inversa*: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en idéntica proporción.
- Si  $-1 < S_{xy} < 0$ , existe una correlación negativa

En realidad la correlación es una medida sobre el grado de relación entre dos variables, sin importar cual es la causa y cual es el efecto. La dependencia de la que se habla en este sentido es la dependencia entre la varianza de las variables [13].

#### **IV.7.7. Análisis de componentes principales**

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible.

Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a prioridad, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales.

Las primeras  $r$  componentes principales bastan para describir en alto porcentaje la variabilidad total de las variables originales. Con frecuencia  $r$  vale 2 o 3, siendo el primero de ellos el caso más deseable.

Cuando el porcentaje de variabilidad explicado por dos componentes principales es alto (70%) se puede realizar una representación gráfica de las variables originales y de los individuos de la muestra (mapas perceptuales) que muestran algunas relaciones de correlación o semejanza entre ellos.

Aunque todas las variables originales entran en la composición de cada componente principal, algunas son más importantes que otras. Estas, las más importantes, determinan la naturaleza de cada componente [14].

#### IV.7.8. Análisis de conglomerados

El **análisis de conglomerados**. Es una técnica multivariante que busca agrupar elementos (o variables) tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencias entre los grupos.

El **dendograma** es la representación gráfica que mejor ayuda a interpretar el resultado de un análisis de conglomerados.

#### Medidas de disimilitud.

Partimos de una matriz de información que contiene las observaciones de todas las variables sobre los diferentes elementos considerados y calculamos las diferencias entre dichos elementos mediante alguna de las medidas de disimilitud habituales: la **distancia**

$$\left( \sqrt{\sum_{j=1}^j (X_{ij} - X_{sj})^2} \right) \quad \left( \sum_{j=1}^j |X_{ij} - X_{sj}| \right)$$

**Euclidiana** su cuadrado, la **distancia de City-Block**

### **Algoritmos de clasificación**

Para clasificar los elementos en clusters utilizaremos **algoritmos jerárquicos**, que pueden ser **acumulativos** (se forman grupos haciendo *clusters* cada vez más grandes) o **diminutivos** (partiendo de un solo grupo se separan los elementos en *clusters* cada vez más pequeños).

Entre los algoritmos jerárquicos acumulativos destacan los siguientes métodos:

- Método de las distancias mínimas: se busca la mayor semejanza entre los elementos o grupos más cercanos.
- Método de las distancias máximas: se calcula la mínima distancia entre los elementos más alejados.
- Método de las distancias medias: se calcula la media de las distancias entre elementos.

### **Presentación de los resultados.**

Para representar la estructura jerárquica de la formación de los conglomerados se utiliza el **dendograma**, un gráfico que tiene forma de árbol invertido. Así, a partir de los K elementos observados podemos identificar desde 1 hasta K, según el número de grupo que queramos obtener, sin más que realizar la segmentación horizontal adecuada [15].

## **V. METODOLOGÍA**

### **V.1. EQUIPOS**

1. Balanza analítica (Ohaus)
2. Horno de convección (Thelco)
3. Campana extractora de gases (Labconco.)
4. Refrigeradora (Cetron)
5. Sistema desionizador de agua (Banstead)
6. Espectrofotómetro (Shimadzu)
7. Bomba de vacío (GE)
8. Baño ultrasónico (Branson)
9. Barómetro digital (Fisher Scientific).
10. Baño María (DAGLEF PATZ)
11. Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Perkin Elmer)

### **V.2. MATERIALES**

1. Soporte universal (Fisher)
2. Condensadores (Pyrex)
3. Balón de destilación de 3 bocas 500 mL (Pyrex)
4. Refrigerantes, Codos, soportes, clanes (Kimax)
5. Perlas de ebullición y mangueras.
6. Balones aforados de 50, 25 10 y 5 mL (Pyrex)
7. Beaker de 50 y 10 mL (Pyrex)
8. Probeta de 100 y 50 mL (Pyrex)
9. Pipetas graduadas 0.1, 1, 5 y 10 mL (Pyrex)
10. Pipeta volumétrica 1 mL (Pyrex)
11. Espátula (Fisher Scientific)
12. Pizeta de 500 mL (Fisher Scientific)
13. Termómetro enviro-safe 200° C (VWR)
14. Jeringas descartable de 3 mL (Napro)
15. Jeringa de 2.5 mL (Hamilton)
16. Filtros de jeringa membrana de nylon 0.20  $\mu$ m (Fisherbrand)

17. Membrana de nylon (0.45  $\mu$ m Millipore)
18. Jeringa de vidrio (2.5 mL)
19. Equipo de destilación (PYREX)
20. Equipo de filtrado (MILLIPORE)

### **V.3. REACTIVOS**

1. Estándar de D- $\alpha$ -Tocoferol (99%, Acrös)
2. n-Hexano (grado HPLC (Merck))
3. Metanol (grado HPLC (Fisher))
4. Isopropanol (Fisher)
5. KOH (Fisher)
6. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Anhidro (Fisher))
7. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98% Fisher)
8. H<sub>2</sub>O destilada
9. Nitrógeno (Merk)

### **V.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

#### **V.4.1. KOH 2N en Metanol.**

Se pesan 0.325g de KOH se vierte en un balón aforado de 25 mL. Y se afora con Metanol.

#### **V.4.2. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.**

Se toman 2.8mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se lleva a un volumen de 50mL en un balón aforado.

#### **V.4.3. Preparación de la solución Madre del estándar DL- $\alpha$ -Tocoferol**

Para la preparación de la solución Madre del estándar se toman el contenido del estándar de  $\alpha$ -tocoferol que se encuentra en el frasco, se pesa el frasco con el estándar luego el frasco vacío y pasamos a la preparación de la dilución con n-Hexano según la concentración a utilizar.

En nuestro caso se tomaron 0.0735g del estándar DL- $\alpha$ -tocoferol y se lleva a dilución con n-Hexano hasta un volumen de 25mL obteniendo una concentración de 0.2912g/100mL incluyendo la pureza de 99% reportado por el fabricante.

#### V.4.4. Preparación de la solución STOCK.

Se tomaron 21mL de la solución Madre con una concentración de 0.2912 g/100mL y se lleva a una solución de 50mL con n-Hexano para obtener una concentración de 0.1223g/100mL.

#### V.4.5. Preparación de solución de TRABAJO.

Se tomaron 6.0mL de la solución STOCK y se lleva a un volumen de 10mL con n-Hexano obteniendo así una concentración de 0.07338g/100mL.

#### V.4.6. Preparación de las soluciones para los puntos de LA RECTA DE REGRESIÓN

La preparación de la soluciones para la recta de regresión se utilizo los datos que se muestran en la tabla siguiente

*Tabla V.5*

Nivel	Volumen de estándar (ml)	Concentración (g/100ml)	Volumen de aforación (ml)
1	0.3	0.0022	10
2	0.5	0.003669	10
3	0.8	0.005870	10
4	1.1	0.008072	10
5	1.4	0.0100273	10

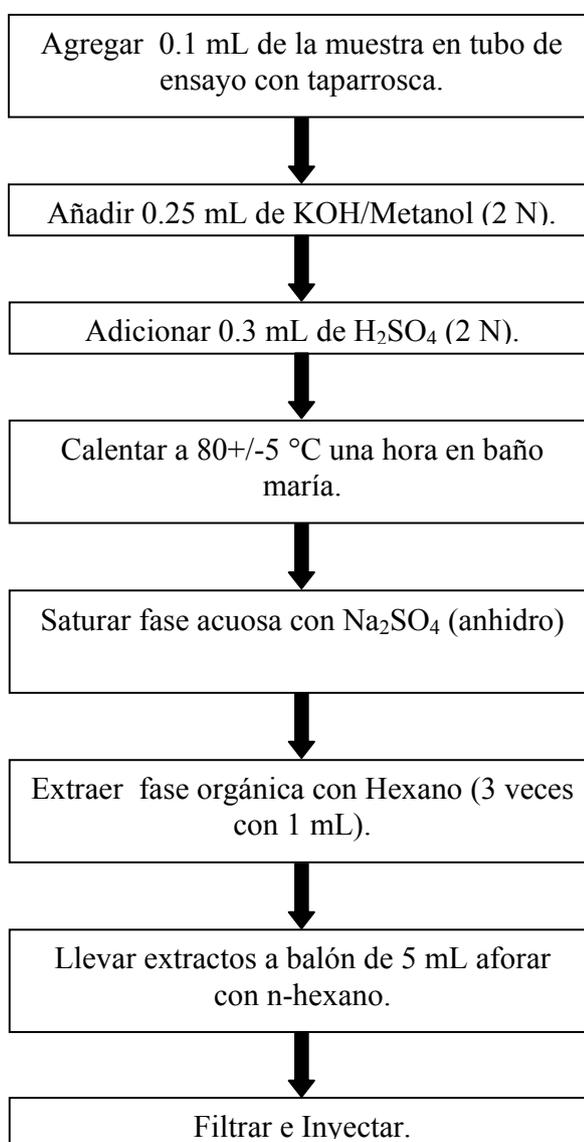
## V.5. MÉTODOS

### V.5.1. MUESTREO

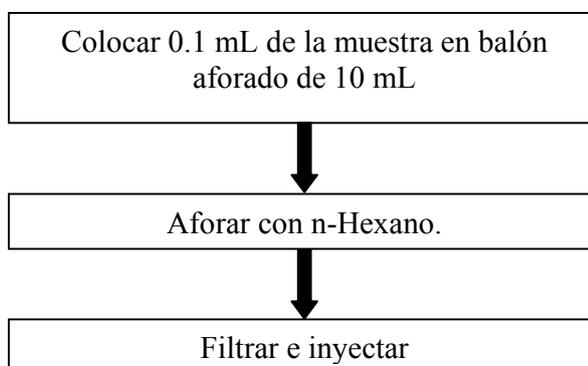
Las muestras analizadas fueron adquiridas en el Supermercado la Unión y el Mercado Central de la ciudad de León. Estos fueron seleccionados según su composición, es decir si eran mezcla o no de semillas. Para la extracción del  $\alpha$ -tocoferol en las muestras analizadas, estas fueron pretratadas de dos formas diferentes: Saponificación y Dilución, cuyos procesos se reflejan en los siguientes flujogramas:

### V.5.2. FLUJOGRAMAS DE PROCEDIMIENTOS

#### V.5.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA SAPONIFICADA



### V.5.2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DILUIDA



#### Criterios de aceptación de las muestras.

La cuantificación del  $\alpha$ -tocoferol en las muestras de aceite, se realizó una vez que el área del pico estuviera dentro del rango de las áreas de los estándares usados para elaborar la recta de regresión.

### V.5.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución se compone de las siguientes partes: Desgasificador, Bomba Cuaternaria, Detector UV, Inyector Manual (20  $\mu$ L), Interfase de Comunicación y Software TurboChrom Work Station.

En el cual se establecieron las siguientes condiciones:

<b>Columna</b>	<b>LiChroCART LiChrospher Si-60, 5<math>\mu</math>m, 125 x 4mm</b>
<b>Fase móvil</b>	<b>Isopropanol/n-Hexano 5/95 (v/v)</b>
<b>Flujo</b>	<b>1.5 mL/min</b>
<b>Volumen de inyección</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>
<b>Detección</b>	<b>292 nm</b>

## VI. ANALISIS DE RESULTADOS

El análisis de las seis marcas de aceites vegetales comerciales incluidos en este estudio, se realizó utilizando dos metodologías analíticas de extracción del  $\alpha$ -tocoferol: saponificación y dilución e inyección directa, las cuales se mencionaban en la tabla IV.2. Se obtuvieron de esta forma dos conjuntos de datos perfectamente diferenciados entre si, los que posteriormente fueron comparados utilizando algunas metodologías estadísticas diseñadas para este fin. Cabe destacar que los análisis del contenido de vitamina E como  $\alpha$ -Tocoferol en los aceites estudiados fueron calculados utilizando análisis de regresión y el error de la determinación se cálculo como la incertidumbre de las predicciones. Así mismo se usaron algunas herramientas de análisis multivariante para establecer similitudes o asociaciones entre las marcas de aceites a la luz de los resultados obtenidos. A continuación se muestran los análisis realizados.

### VI.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE $\alpha$ -TOCOFEROL EN LAS MUESTRAS DILUIDAS Y SAPONIFICADAS.

En la Figura VI.1 se muestran los cromatogramas de los estándares de Vitamina E como  $\alpha$ -Tocoferol, inyectados según las condiciones mostradas el apartado V.5.2. Los niveles de concentración y las áreas correspondientes son mostrados en la tabla VI.1.

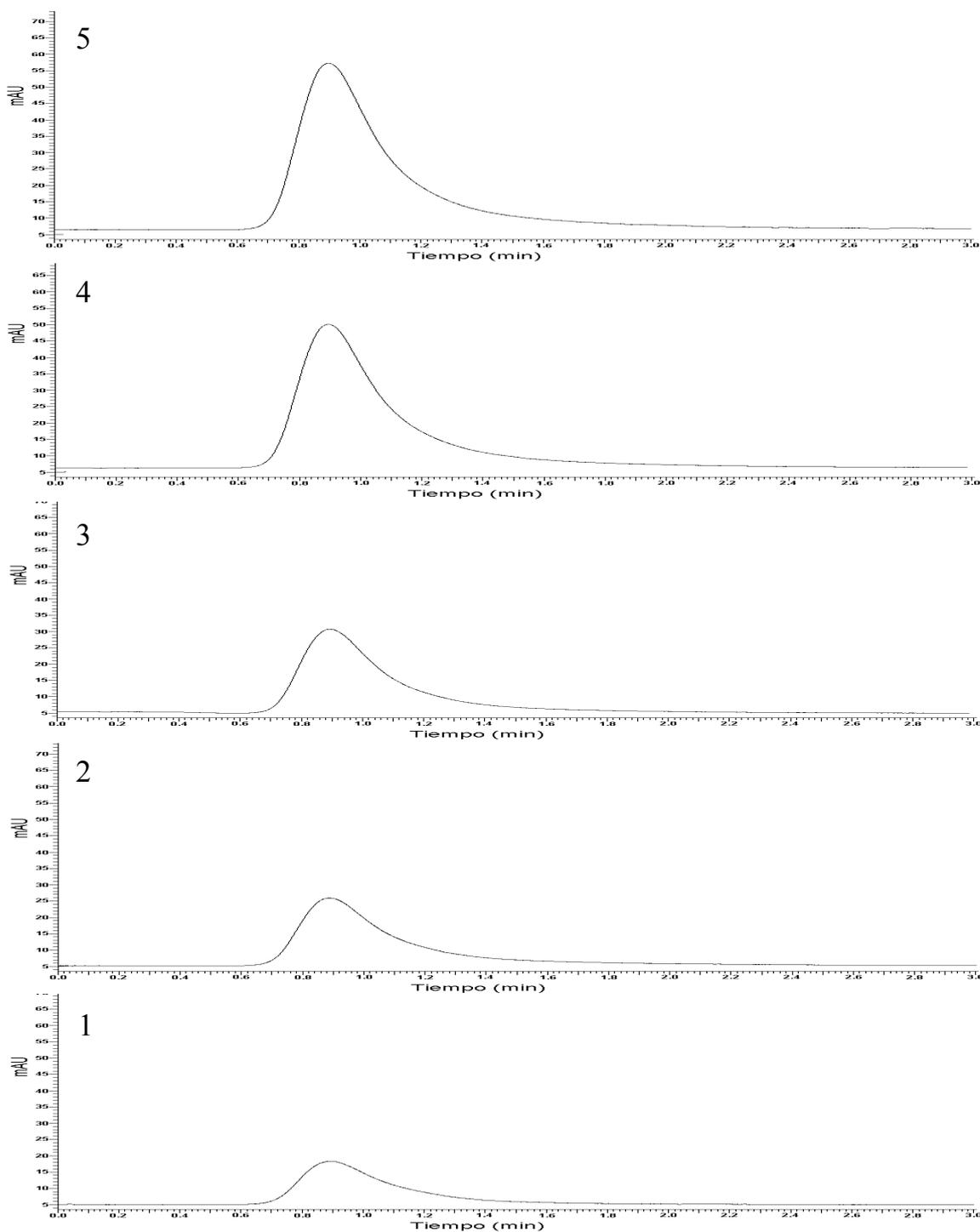
**Tabla VI.1.** Niveles de concentración de las inyecciones de  $\alpha$ -Tocoferol.

Nivel	Concentración (%)	Área
1	0.0022	211118.50
2	0.0037	363923.80
3	0.0059	564046.30
4	0.0081	761679.10
5	0.0103	962813.70

Los niveles de concentración  $\alpha$ -Tocoferol, mostrados en la tabla VI.1 y usados para elaborar la recta de regresión fueron seleccionados sobre la base del criterio de concentración esperada de compuesto en las muestras de aceites comerciales objeto de estudio y que tuvieron su origen en la comparación de inyecciones previas de las muestras y de estándares de concentración conocida.

Tal y como se observa en la figura VI.1., el tiempo de retención del  $\alpha$ -Tocoferol en los cromatogramas obtenidos, permite establecer una clara diferencia e identificación de éste, por otra parte es el único pico que aparece en el cromatograma, siendo imposible su no identificación.

Cabe mencionar que la posición del pico en el cromatograma no es coincidente con la información obtenida en la bibliografía, lo que a nuestro parecer, es debido a las diferentes condiciones de separación empleadas en la bibliografía respecto a nuestro trabajo, entre las que se destaca el tipo de columna empleada, lo cual no quita validez a nuestro trabajo, ya que el pico del  $\alpha$ -Tocoferol, pudo ser identificado en nuestras condiciones de trabajo, lo cual se confirma en los cromatogramas obtenidos.



**Figura VI.1.** Cromatogramas del estándar usado en la elaboración de la recta de regresión. Niveles, 1, 2, 3, 4, y 5, de concentraciones, 0.0022, 0.0037, 0.0059, 0.0081 y 0.0103%, respectivamente.

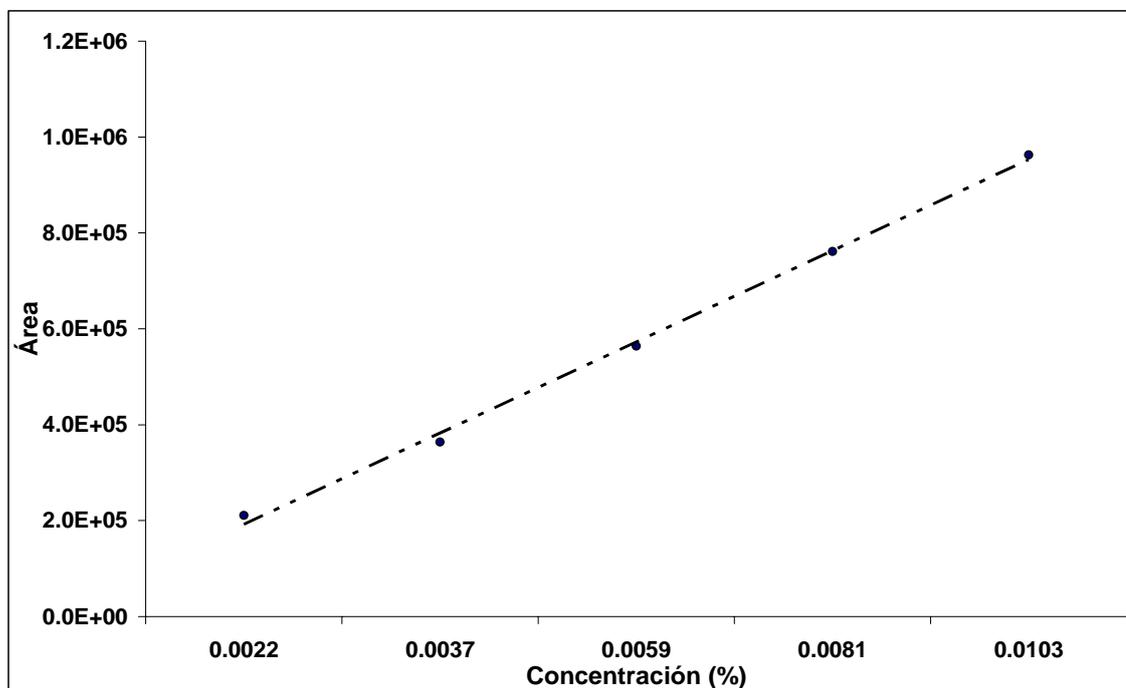
En la Tabla VI.2., se muestran los valores de los parámetros de ajuste de la recta de regresión del  $\alpha$ -Tocoferol, obtenida en los rangos de concentración mencionados en la tabla VI.1. En esta se puede observar que el ajuste de las rectas fue excelente siendo el  $r^2$  mayor de 0.999. Este valor nos indica la excelente bondad del ajuste de la recta al modelo de regresión empleado, razón por la cual podemos utilizarla para la determinación de la concentración de  $\alpha$ -Tocoferol en las muestras de aceite vegetal comercial de este estudio.

**Tabla VI.2.** Parámetros de ajuste de la recta de regresión de los estándares de  $\alpha$ -Tocoferol

Compuesto	a	b	$r^2$
$\alpha$ -Tocoferol	16839.72	92423290.81	0.99950

Según los resultados reflejados en la tabla VI.2., la ecuación de la recta obtenida sería:

En la Figura VI.2, se muestra la recta de regresión obtenida para el estándar de  $\alpha$ -Tocoferol, y de la cual se obtuvo los parámetros de ajuste mostrados en la tabla VI.2.



**Figura VI.2.** Recta de regresión de concentración vs. áreas, del estándar de  $\alpha$ -Tocoferol.

En las Figuras VI.3. y VI.4., se muestran los cromatogramas de las muestras de los aceites comerciales que fueron sometidas al proceso de dilución, mientras que en las Figuras VI.5. y VI.6., se muestran las que fueron sometidas al proceso de saponificación.

Es importante destacar que todos los cromatogramas mostrados en este estudio fueron graficados, tanto para el del estándar como los de las muestras, utilizando la misma escala en ambos ejes, X (tiempo), Y (área), esto con el fin de establecer un punto comparativo visual, que nos ayudara a comprender las diferencias o similitudes entre éstos.

Tal y como se observa en los cromatogramas de las muestras de los aceites comerciales, tanto las diluidas como las saponificadas, presentan el pico característico del  $\alpha$ -Tocoferol.

Una observación detallada de los cromatogramas de las muestras permite establecer diferencias evidentes entre éstas y entre los procedimientos de extracción ensayados. Por otra parte el desplazamiento de los tiempos de retención del pico del  $\alpha$ -Tocoferol respecto al tiempo de retención del estándar no fue significativo, lo que nos permitió una efectiva identificación y cuantificación, del  $\alpha$ -Tocoferol en las muestras analizadas.

En la Tabla VI.3. se muestran las áreas promedio de las muestras diluidas y saponificadas, en las tablas XI.2 y XI.3 ubicadas en anexo se presentan los resultados de las áreas de las muestras diluidas y saponificadas inyectadas por triplicado. En la Tabla VI.4., se muestran las concentraciones en g/100 mL de  $\alpha$ -Tocoferol encontradas en las muestras diluidas y saponificadas de los aceites vegetales comerciales estudiados, obtenidas a partir de la ecuación de la recta de regresión en la cual se despeja X (concentración).

Por ejemplo, para la muestra Clover diluida, el cálculo de la concentración, se hizo como sigue:

$$X = \frac{y - a}{b} = \frac{564903.7 - 16839.72}{92423290.81} = 0.00593 \text{ g/100 mL}$$

Posteriormente, este valor se multiplicó por el respectivo Factor de Dilución, que se presenta en la tabla XI.2 y XI.3 en anexo.

$$\text{Concentración real} = \text{Concentración calculada} \times \text{FD} = 0.00593 \times 100 = 0.593 \text{ g/100 mL}$$

Cabe destacar que en el caso de las muestras diluidas, las concentraciones iniciales encontradas a partir de la recta de regresión, fueron multiplicadas por 100, salvo en el caso del aceite Mazola en el que se utilizó 55.555, esto debido a los factores de dilución.

Por otra parte en lo que se refiere a las muestras saponificadas todas las concentraciones iniciales encontradas a partir de la recta de regresión, fueron multiplicadas por 50, también debido al factor de dilución de las muestras.

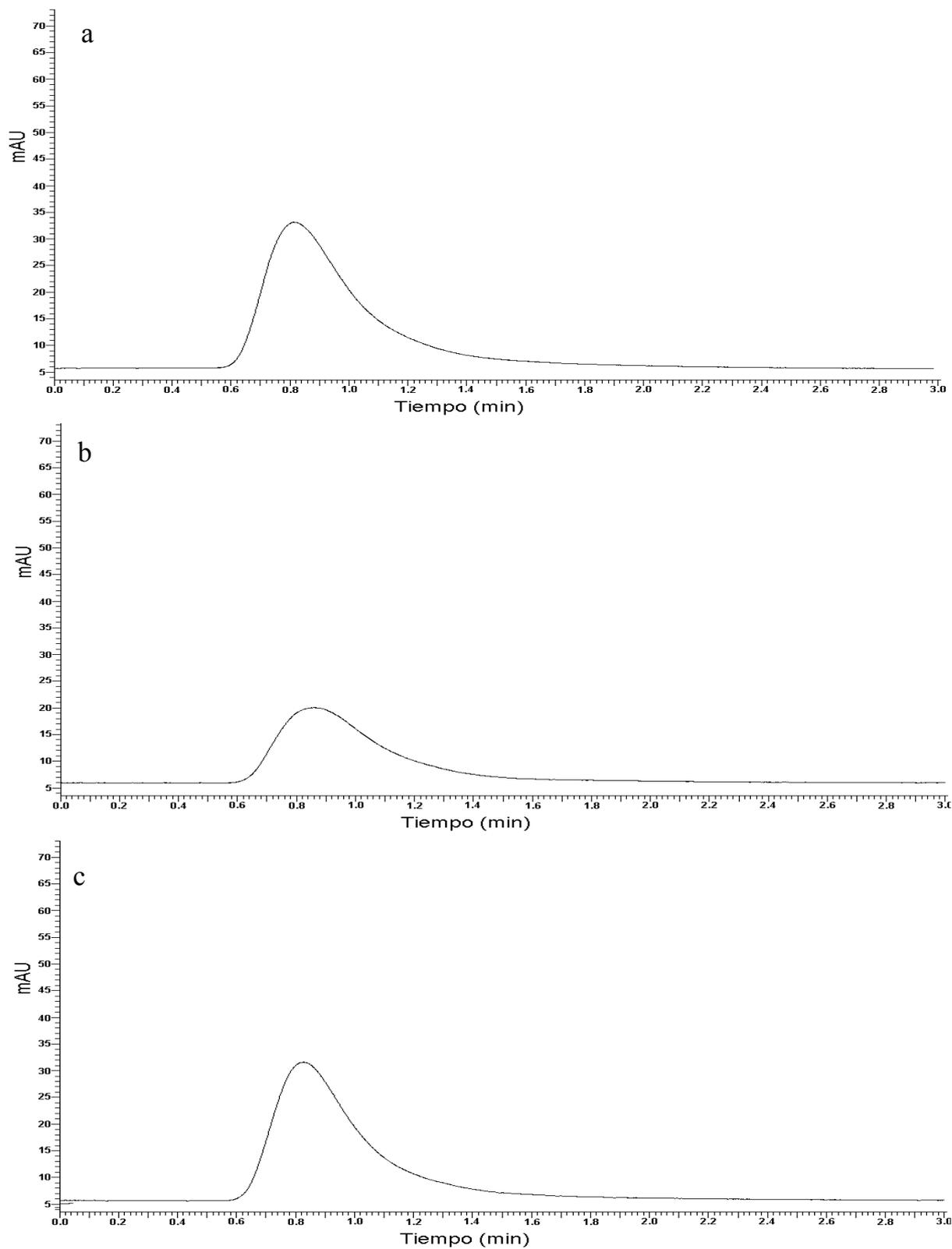
En la Figura VI.7., se muestra los resultados de la Tabla VI.4 en forma de grafico de barras.

**Tabla VI.3.** Media de las áreas de los picos de  $\alpha$ -Tocoferol, de las muestras diluidas y saponificadas de los aceites vegetales comerciales estudiados.

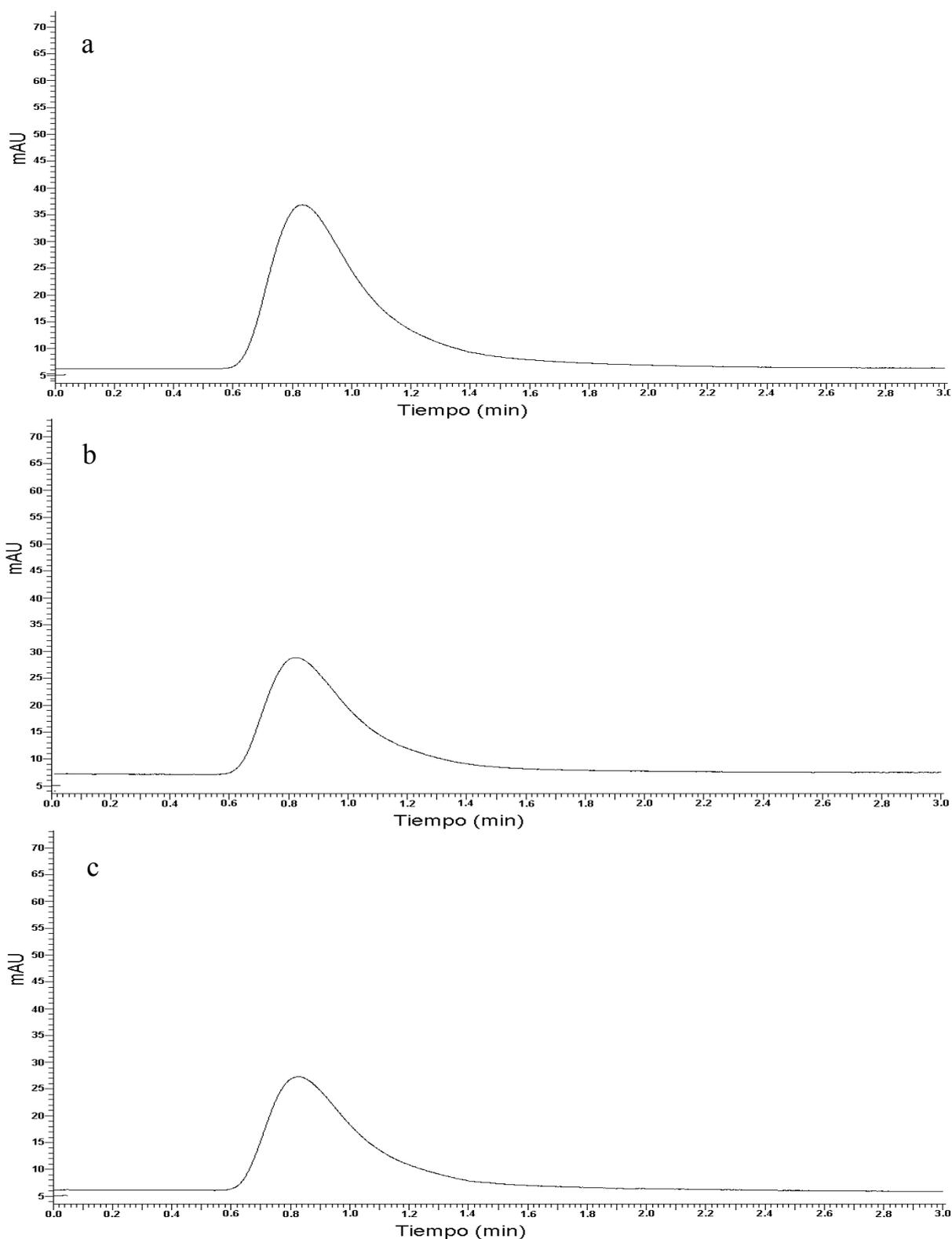
	<b>Clover</b>	<b>Girol</b>	<b>Regia</b>	<b>Sabemas</b>	<b>Mazola</b>	<b>Crisco</b>
<b>Diluidas</b>	564903.7	489510.3	426789.4	422321.1	631215.1	298036.6
<b>Saponificadas</b>	653974.5	372543.1	612243.3	635228.3	392275.9	602257.7

**Tabla VI.4** Media de las concentraciones porcentuales de  $\alpha$ -Tocoferol, de las muestras diluidas y saponificadas. Se muestra así mismo las incertidumbres de las predicciones.

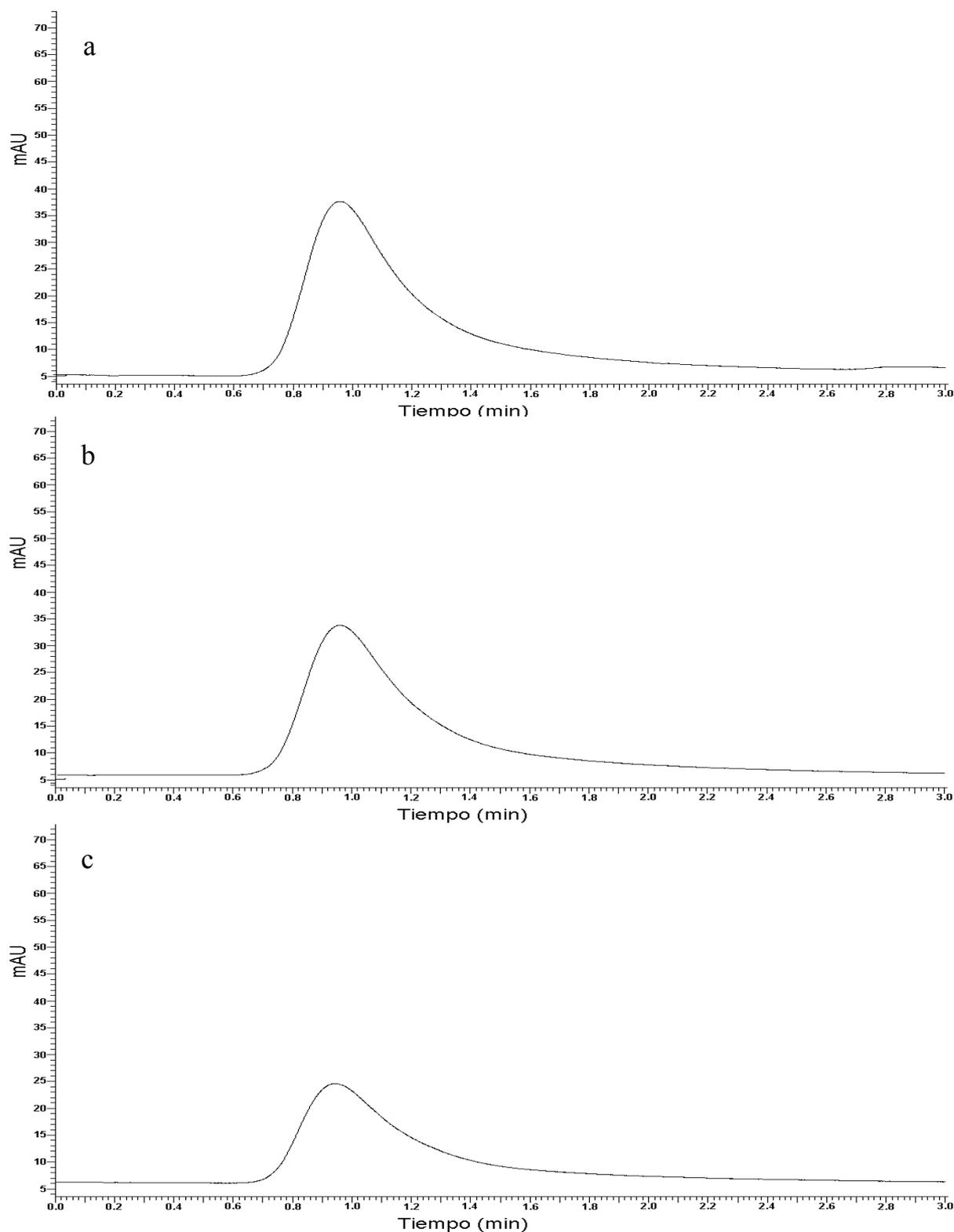
<b>Muestras</b>	<b>Diluidas (g/100 mL)</b>			<b>Saponificadas (g/100 mL)</b>		
<b>Clover</b>	0.593	+/-	0.016	0.345	+/-	0.008
<b>Girol</b>	0.511	+/-	0.016	0.192	+/-	0.009
<b>Regia</b>	0.444	+/-	0.017	0.322	+/-	0.008
<b>Sabemas</b>	0.439	+/-	0.017	0.335	+/-	0.008
<b>Mazola</b>	0.369	+/-	0.009	0.203	+/-	0.009
<b>Crisco.</b>	0.304	+/-	0.019	0.317	+/-	0.008



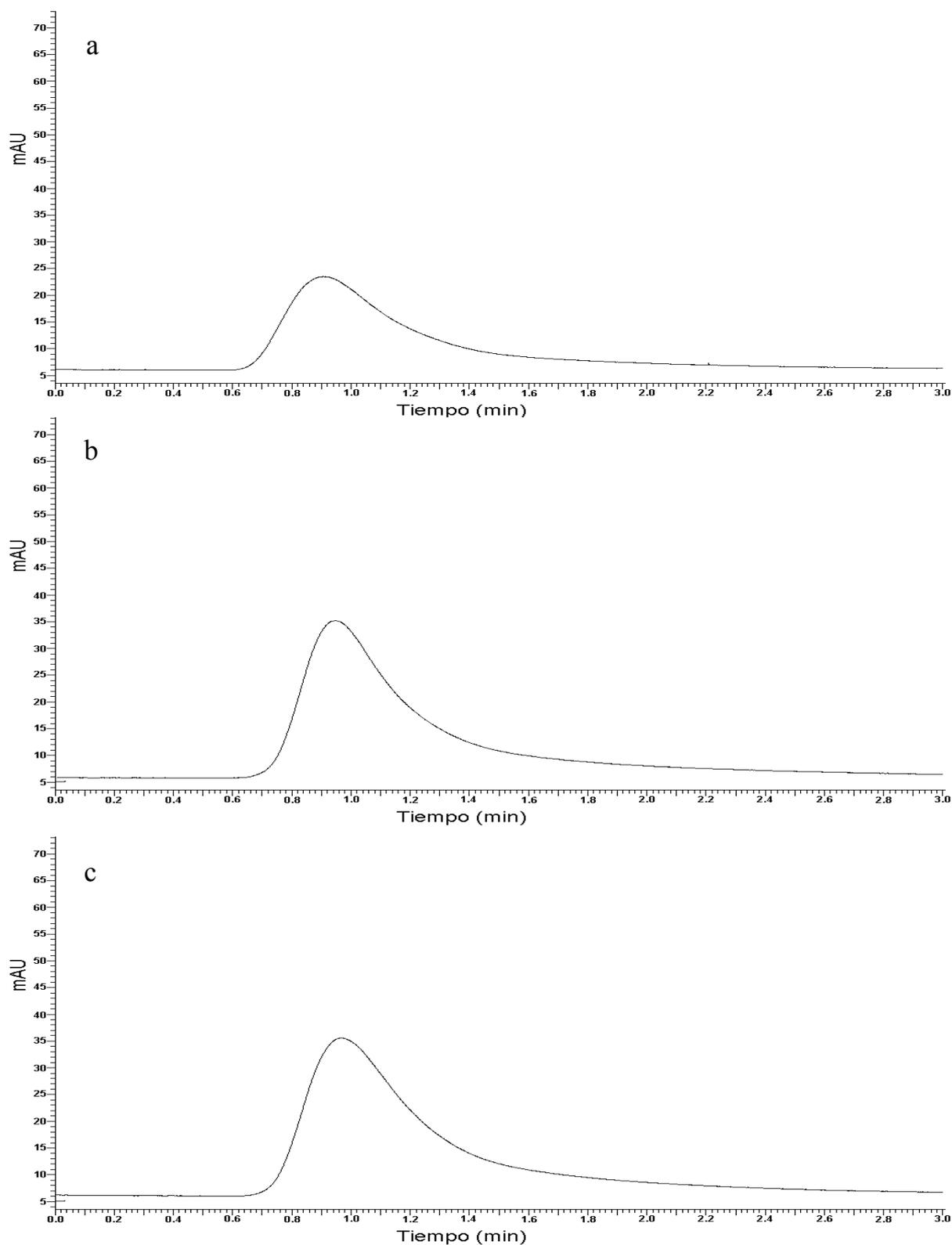
**Figura VI.3.** Cromatogramas de las muestras de aceites diluidas en n-hexano: Clover (a), Crisco (b) y Girol (c), en los que se muestra el pico de la  $\alpha$ -tocoferol.



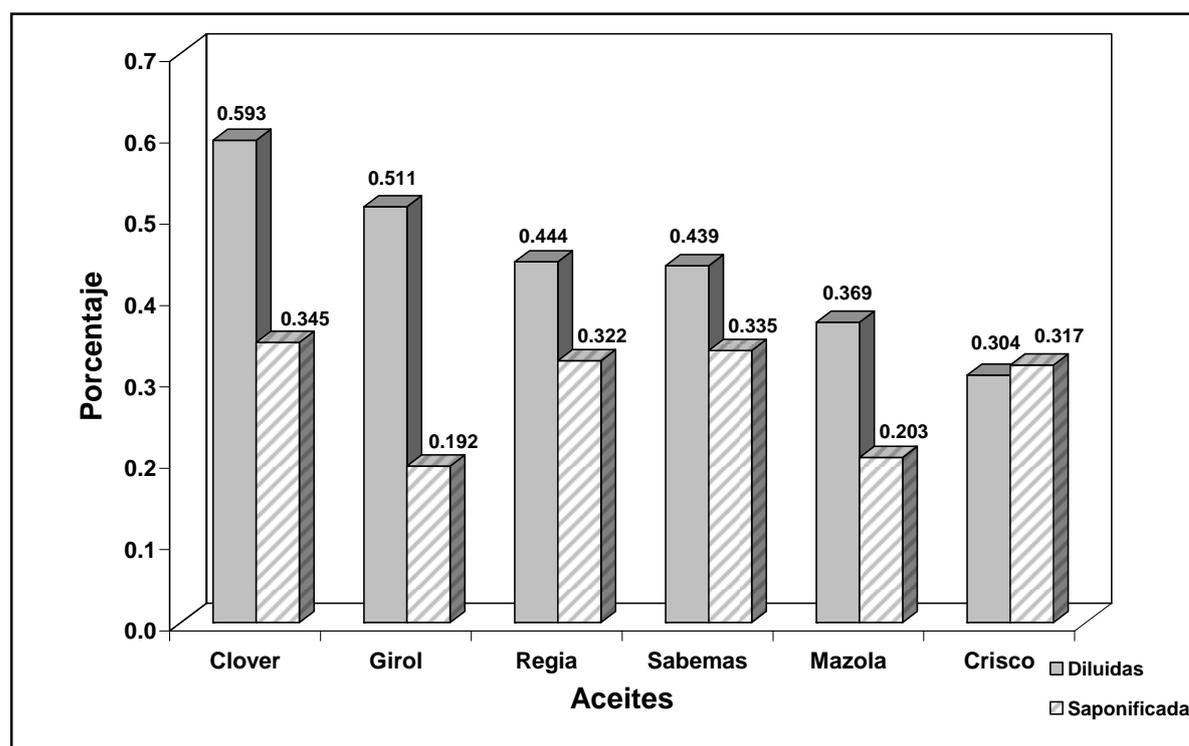
**Figura VI.4.** Cromatogramas de las muestras de aceites diluidas en *n*-hexano: Mazola (a), Regia (b) y Sabemas (c), en los que se muestra el pico de la  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura VI.5.** Cromatogramas de las muestras de aceites saponificadas con KOH: Clover (a), Crisco (b) y Girol (c), en los que se muestra el pico de la  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura VI.6.** Cromatogramas de las muestras de aceites saponificadas con KOH: Mazola (a), Regia (b) y Sabemas (c), en los que se muestra el pico de la  $\alpha$ -tocoferol



**Figura VI.7.** Grafico del porcentaje de  $\alpha$ -Tocoferol, en las muestras de aceites objetos de este estudio, tanto diluidas como saponificadas.

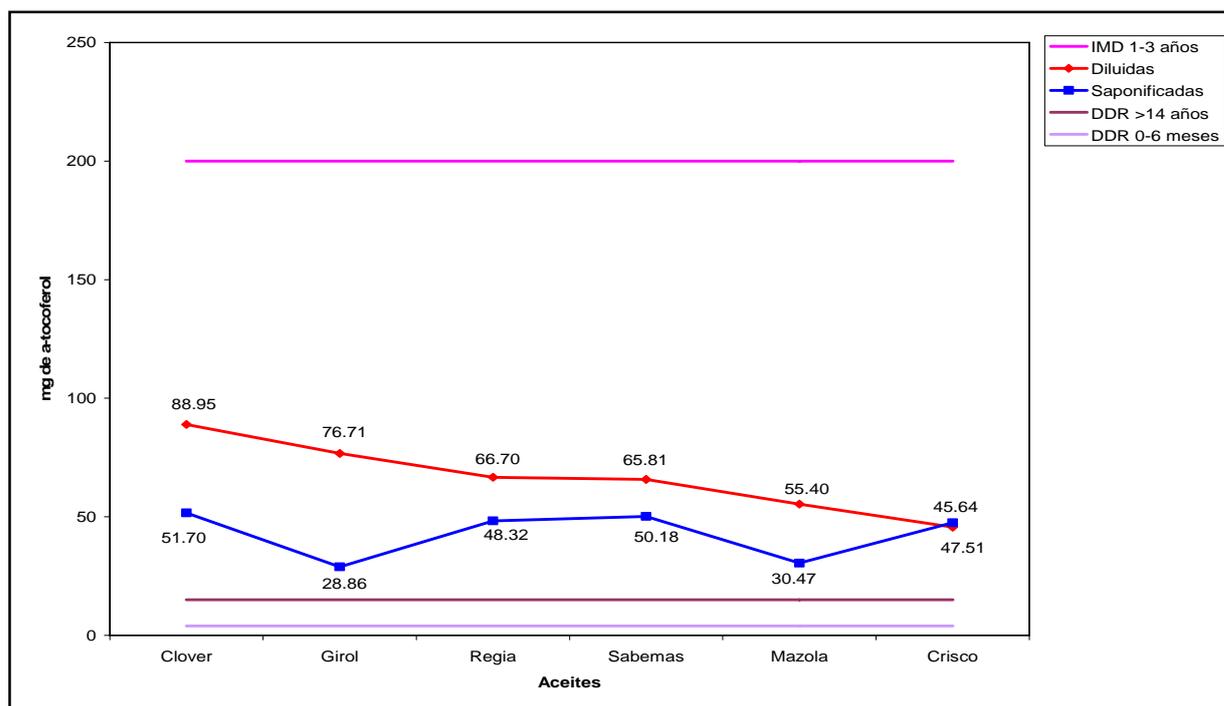
Una observación detallada de la figura VI.7., permite vislumbrar la existencia de diferencias entre los porcentajes de  $\alpha$ -Tocoferol presentes en las muestras estudiadas tanto diluidas como saponificadas. Claramente se observa que las muestras diluidas muestran mayores porcentajes de  $\alpha$ -Tocoferol, salvo para el caso de la muestra de aceite Crisco, la que presentó un ligero aumento de la saponificada, respecto de la diluida. En general, se observó un 40% de aumento de la concentración de  $\alpha$ -Tocoferol, en las muestras diluidas respecto a las saponificadas, excepto en la muestra de Crisco cuya concentración fue un 4% mayor de la saponificada respecto a la diluida.

Las diferencias observadas en las concentraciones de  $\alpha$ -Tocoferol, muestra claramente una mayor ventaja del proceso de dilución respecto al de saponificación, lo que aunado al menor tiempo de análisis de la muestra en el proceso de dilución, nos induce a pensar que este proceso es el mas adecuado para el análisis de  $\alpha$ -Tocoferol en muestra de aceite vegetal comercial. Creemos que la mayor concentración de  $\alpha$ -Tocoferol observada en la muestra de aceite Crisco, puede ser debida a procesos de saturación de la columna, a acumulación en el inyector o posiblemente a una mayor efectividad del proceso de saponificación de este aceite, este fenómeno puede ser estudiado más profusamente en otra monografía.

## VI.2. APORTE A LA DOSIS DIARIA RECOMENDADA (DDR) DE $\alpha$ -TOCOFEROL DE LAS MUESTRAS DILUIDAS Y SAPONIFICADAS.

Desde hace mucho tiempo se ha establecido la importancia del aporte de ciertos aceites vegetales a la nutrición de los seres humanos, en la tabla IV.3 se mostró la Dosis Diaria Recomendada (DDR) es decir lo que se debe ingerir diariamente de vitamina E, mientras que en la tabla IV.4, se mostró la Ingesta Máxima Diaria (IMD) de esta vitamina, esto es el máximo permisible.

Realizando la conversión de unidades g/100 mL a mg/1 cucharada (15 mL), que es una cantidad adecuada para el consumo de aceite, se relacionaron nuestros resultados con la DDR e IMD. Encontrándose que todos los aceites vegetales comerciales, independientemente del pretratamiento al que fueron sometidos exceden sin lugar a dudas los requerimientos diarios de vitamina E como  $\alpha$ -tocoferol. Sin embargo, no sobrepasan la IMD mínima que es de 200 mg lo cual ha sido representado en la Fig. VI.8 y cuyos datos se encuentran en anexo (tabla IX.4)



**Figura VI.8.** Miligramos de  $\alpha$ -Tocoferol, contenidos en una cucharada (15 mL) de aceite.

### VI.3. ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS ENCONTRADAS EN CONTENIDO DE $\alpha$ -TOCOFEROL EN LAS MUESTRAS DILUIDAS Y SAPONIFICADAS

Una vez que se obtuvieron los datos porcentuales tanto de las muestras diluidas como saponificadas y dado que se habían detectado evidentes diferencias (ver Figura VI.7.), entre las muestras razón de nuestro estudio, consideramos adecuado la realización de pruebas de comparación y de asociación, que nos ayudaran a establecer o desechar, las diferencias observadas. Entre las pruebas realizadas se mencionan:

- Comparación de las varianzas de los datos de los aceites estudiados, aplicando el test de Bartlett, esto con el fin de detectar homogeneidad o heterocedasticidad de las varianzas, es decir si las varianzas de los aceites son iguales o diferentes.
- Análisis de varianzas (ANOVA) de un factor para detectar similitud o diferencia entre las medias de los resultados de los aceites estudiados, esto para identificar igualdades o diferencias entre los aceites.
- Matriz de correlaciones, esto para establecer asociaciones entre los aceites estudiados, sobre la base de sus coeficientes de correlación.
- Análisis de componentes principales, al igual que en el caso de las correlaciones, lo realizamos para establecer asociaciones entre los aceites estudiados.
- Análisis de conglomerados o Dendogramas, esto para confirmar lo establecido en las correlaciones y en el Análisis de Componentes Principales, es decir las asociaciones entre los aceites estudiados.

En la tabla V.6. se muestran los resultados del test de Bartlett, tanto para las muestras diluidas como saponificadas. El test ensayado fue realizado con el software XLSTAT 2008. Las hipótesis nulas y alternativa a ser consideradas fueron las siguientes:

$$H_0 : S^2_{\text{Clover}} = S^2_{\text{Girol}} = S^2_{\text{Regia}} = S^2_{\text{Sabemas}} = S^2_{\text{Mazola}} = S^2_{\text{Crisco}}$$

$$H_1 : S^2_{\text{Clover}} \neq S^2_{\text{Girol}} \neq S^2_{\text{Regia}} \neq S^2_{\text{Sabemas}} \neq S^2_{\text{Mazola}} \neq S^2_{\text{Crisco}}$$

Se consideró que la hipótesis nula se aceptaba si:

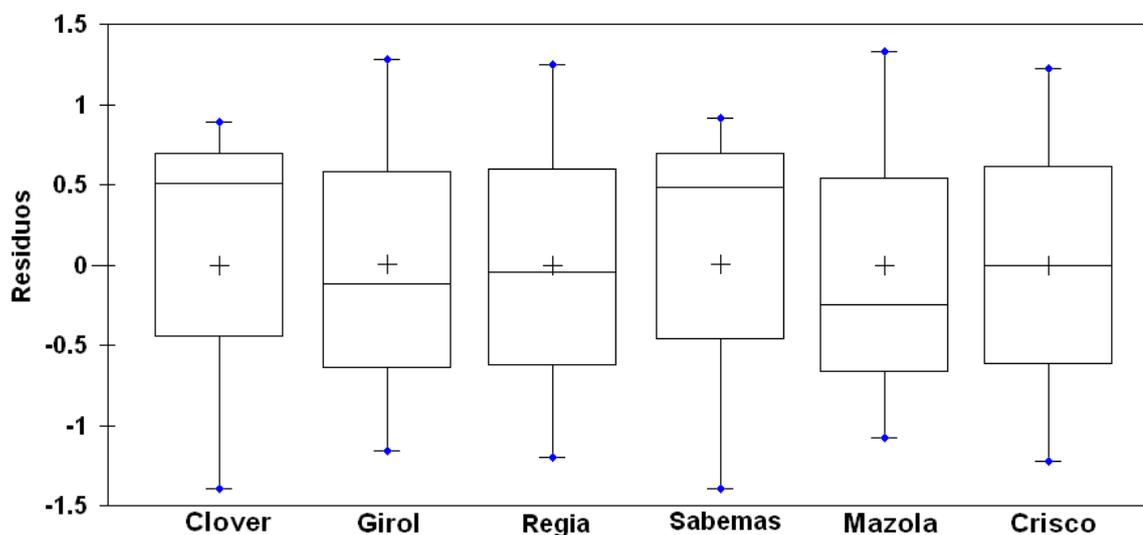
$$\chi^2_{\text{cal}} < \chi^2_{\text{tab}}$$

Tal y como se observa en la Tabla VI.5., las muestras diluidas, presentan un valor menor de  $\chi^2$  calculado que el tabulado a diferencia de las saponificadas que presentan un valor mayor del calculado que el tabulado, lo cual nos indica que las muestras diluidas presentan igualdad u homogeneidad de varianzas mientras que las saponificadas presentan desigualdad u heterogeneidad de las varianzas, esto quiere decir que al menos una de las varianzas del conjunto de las varianzas de las muestras saponificadas es diferente.

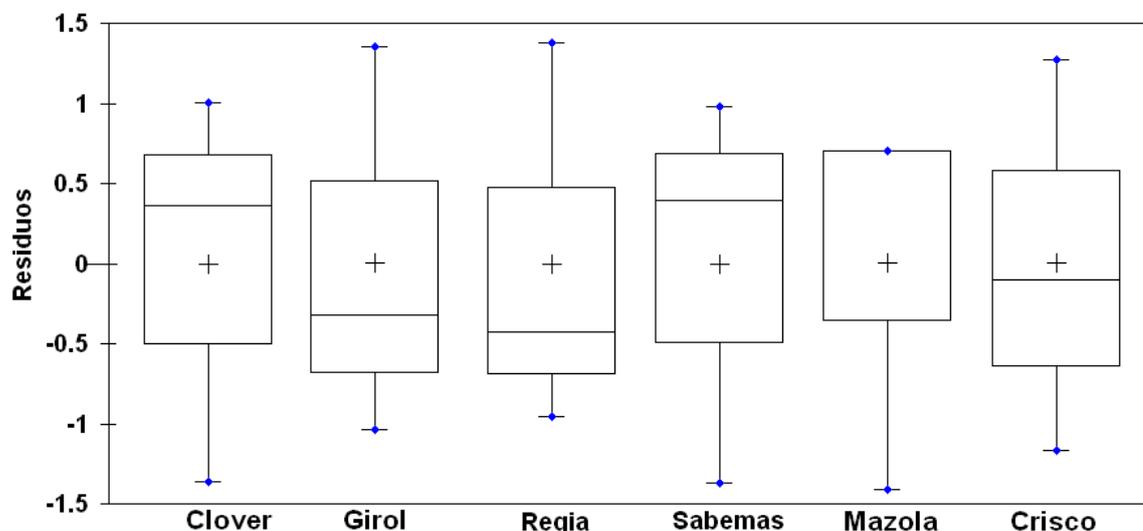
**Tabla VI.5.** Resultados del Test de Bartlett de las muestras diluidas y saponificadas

	Diluidas	Saponificadas
Chi-cuadrado ajustado (Calculado)	4.238	14.045
Chi-cuadrado (Tabla)	11.070	11.070
GL	5	5
$\alpha$	0.05	0.05

En las Figuras VI.9. y VI.10., se observan los gráficos de cajas, obtenidos de los datos de las muestras diluidas y saponificadas, los que fueron normalizados con el fin de lograr que se ubicaran en una misma escala.



**Figura VI.9.** Gráfico de cajas de los resultados normalizados de las muestras diluidas.



**Figura VI.10.** Gráfico de cajas de los resultados normalizados de las muestras saponificadas.

Tal y como se observa en los gráficos de cajas de la Figura VI.9. En tres de las muestras de aceites, la mediana se aproxima a la media de los resultados, en uno se acerca un poco menos y en dos casos la media se aleja de la mediana. También se refleja el hecho de que los extremos máximos y mínimos de los gráficos, en los que la mediana se aproxima a la media, tienen una distribución más uniforme y menos uniforme en el caso en que la media se aleja de la mediana. Por otra parte los gráficos de cajas de la Figura VI.10., se observa que sólo en un caso la mediana se aproxima a la media y en todos los restantes casos la media se aleja de la mediana. En el caso del aceite Mazola, el extremo superior se ubica en el cuartil superior, lo que nos indica una clara anomalía de este respecto a los otros aceites.

Los comentarios anteriores nos proporcionan una explicación, bastante aproximada del porque de los resultados obtenidos con el Test de Bartlett para estas muestras. Lo cual es bastante evidente con la observación detallada de las Figuras VI.9. y VI.10, es decir varianzas homogéneas y heterogéneas.

Ante esta situación optamos por aplicar el Test de Dixon al aceite Mazola encontrando que:

$$Q_{\text{cal}} = 0.745 \quad Q_{(0.05, 6)} = 0.628$$

Siendo las hipótesis nulas y alternativas:

$H_0$ : Valor sospechoso = media de los resultados (el valor no es anómalo)

$H_1$ : Valor sospechoso  $\neq$  media de los resultados (el valor es anómalo)

Considerando que se acepta  $H_0$  si:  $Q_{\text{cal}} < Q_{\text{tab}}$ , y el valor no es anómalo y no debe rechazarse.

Dado que la media de los resultados del aceite Mazola, demuestran que no es representativo de la nube de datos correspondientes a los otros aceites. Una vez eliminado el valor correspondiente a este aceite, aplicamos nuevamente el Test de Bartlett, a las restantes muestras saponificadas lo que mejoró notablemente los resultados y se obtuvo homogeneidad de las varianzas. Los nuevos resultados se muestran en la Tabla VI.6.

Por lo que a continuación desarrollamos los restantes procesos de comparación sin el aceite Mazola en las muestras saponificadas.

**Tabla VI.6.** Resultados de la nueva aplicación del Test de Bartlett a las muestras saponificadas

	<b>Saponificadas</b>
Chi-cuadrado ajustado (Calculado)	9.050
Chi-cuadrado (Tabla)	9.488
GL	4
$\alpha$	0.05

Ramis Ramos y García Álvarez-Coque, en su libro “Quimiometría”, nos indican que para poder estudiar conjuntos de tres o más series de medidas mediante ANOVA, es imprescindible primero demostrar la homogeneidad de las varianzas. Una vez realizado la eliminación del aceite Mazola en el conjunto de muestras saponificadas y encontrada la homogeneidad de las varianzas de los dos conjuntos de datos (diluidas y saponificadas), se realizó el Análisis de varianza de un factor de los dos conjuntos de muestras, esto para encontrar similitudes o diferencias en las medias de los datos.

Las hipótesis nulas y alternativas, para el caso de las muestras diluidas fueron:

$$H_0 : \bar{X}_{\text{Clover}} = \bar{X}_{\text{Girol}} = \bar{X}_{\text{Regia}} = \bar{X}_{\text{Sabemas}} = \bar{X}_{\text{Mazola}} = \bar{X}_{\text{Crisco}}$$

$$H_1 : \bar{X}_{\text{Clover}} \neq \bar{X}_{\text{Girol}} \neq \bar{X}_{\text{Regia}} \neq \bar{X}_{\text{Sabemas}} \neq \bar{X}_{\text{Mazola}} \neq \bar{X}_{\text{Crisco}}$$

Mientras que para las muestras saponificadas fueron:

$$H_0 : \bar{X}_{\text{Clover}} = \bar{X}_{\text{Girol}} = \bar{X}_{\text{Regia}} = \bar{X}_{\text{Sabemas}} = \bar{X}_{\text{Crisco}}$$

$$H_1 : \bar{X}_{\text{Clover}} \neq \bar{X}_{\text{Girol}} \neq \bar{X}_{\text{Regia}} \neq \bar{X}_{\text{Sabemas}} \neq \bar{X}_{\text{Crisco}}$$

Considerando que se acepta  $H_0$  si:  $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ , por lo que las medias de los conjuntos de datos son iguales en caso contrario al menos una de las medias es diferente del conjunto.

Los resultados de la aplicación del ANOVA a los dos conjuntos de datos se muestran en las Tablas VI.7. y VI.8.

**Tabla VI.7.** Resultados del ANOVA de las muestras diluidas.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
Entre grupos	0.156	5	0.031	232.741	3.106
Dentro de los grupos	0.002	12	0.000		
Total	0.157	17			

**Tabla VI.8.** Resultados del ANOVA de las muestras saponificadas.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
Entre grupos	0.047	4	0.012	68.876	3.478
Dentro de los grupos	0.002	10	0.000		
Total	0.048	14			

Tal y como se observa en las tablas VI.7. y VI.8., en los dos casos  $F_{cal} > F_{tab}$ , por lo que podemos decir que en los dos conjuntos de datos al menos una de las medias es distinta de las demás. Revisando el libro de Ramis Ramos y García Álvarez-Coque, a este respecto, encontramos que cuando un resultado de ANOVA nos indica diferencia de medias es necesario pasar a identificar la posible muestra cuyos resultados discrepan de los demás.

Debido a la cantidad de muestras involucradas (6 diluidas y 5 saponificadas), consideramos oportuno la aplicación de dos herramientas de análisis multivariante que nos ayudarían a identificar los datos discrepantes, mediante asociaciones. En las Tablas VI.9. y VI.10. se muestran las matrices de correlaciones de las muestras de aceites diluidas y saponificadas.

**Tabla VI.9.** Matriz de correlación de las muestras diluidas.

	Clover	Girol	Regia	Sabemas	Mazola	Crisco
Clover	<b>1</b>					
Girol	0.236	<b>1</b>				
Regia	-0.799	0.396	<b>1</b>			
Sabemas	<b>0.945</b>	-0.095	<b>-0.952</b>	<b>1</b>		
Mazola	0.328	<b>0.995</b>	0.306	0.001	<b>1</b>	
Crisco	0.156	<b>0.997</b>	0.470	-0.176	<b>0.984</b>	<b>1</b>

**Tabla VI.10.** Matriz de correlación de las muestras saponificadas.

	<b>Clover</b>	<b>Girol</b>	<b>Regia</b>	<b>Sabemas</b>	<b>Crisco</b>
<b>Clover</b>	<b>1</b>				
<b>Girol</b>	<b>-0.846</b>	<b>1</b>			
<b>Regia</b>	0.040	-0.566	<b>1</b>		
<b>Sabemas</b>	-0.016	0.546	<b>-1.000</b>	<b>1</b>	
<b>Crisco</b>	-0.754	<b>0.988</b>	-0.686	<b>0.669</b>	<b>1</b>

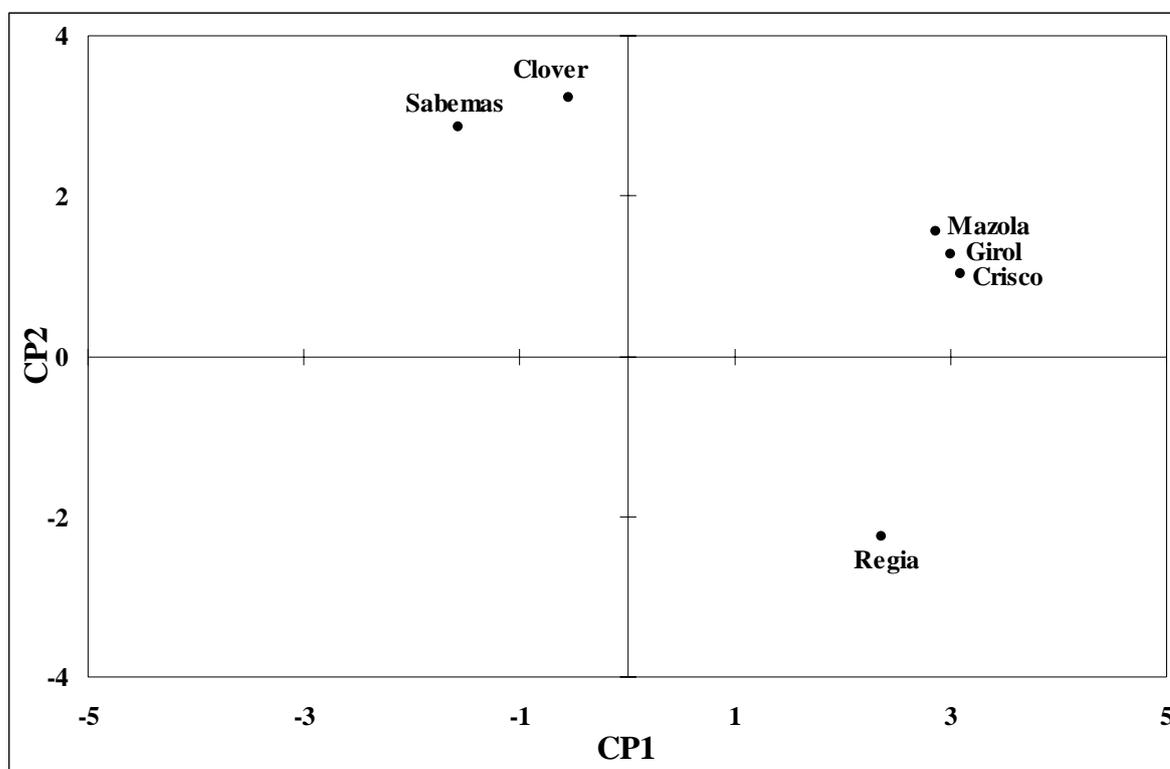
En las matrices de correlación se parte del principio que cuanto mas cercano es el coeficiente a 1 mayor es la asociación o dependencia de las variables involucradas es decir se encuentran mas “correlacionadas” y cuanto mas se aleje de 1 menor es la asociación o dependencia de las variables es decir menos se encuentran “correlacionadas”, siendo el 1 la máxima correlación y el 0 la ausencia total de correlación.

Tal y como se observa en la Tabla VI.9., los aceites Girol y Crisco y Girol y Mazola, se encuentran bastante correlacionados, es de esperar por tanto que estos formen grupos o asociaciones, por otra parte los aceites Clover y Sabemas, Regia y Sabemas y Mazola y Crisco, se encuentran parcialmente correlacionados es decir en menor medida, por lo que de alguna manera deberían formar asociaciones relativas.

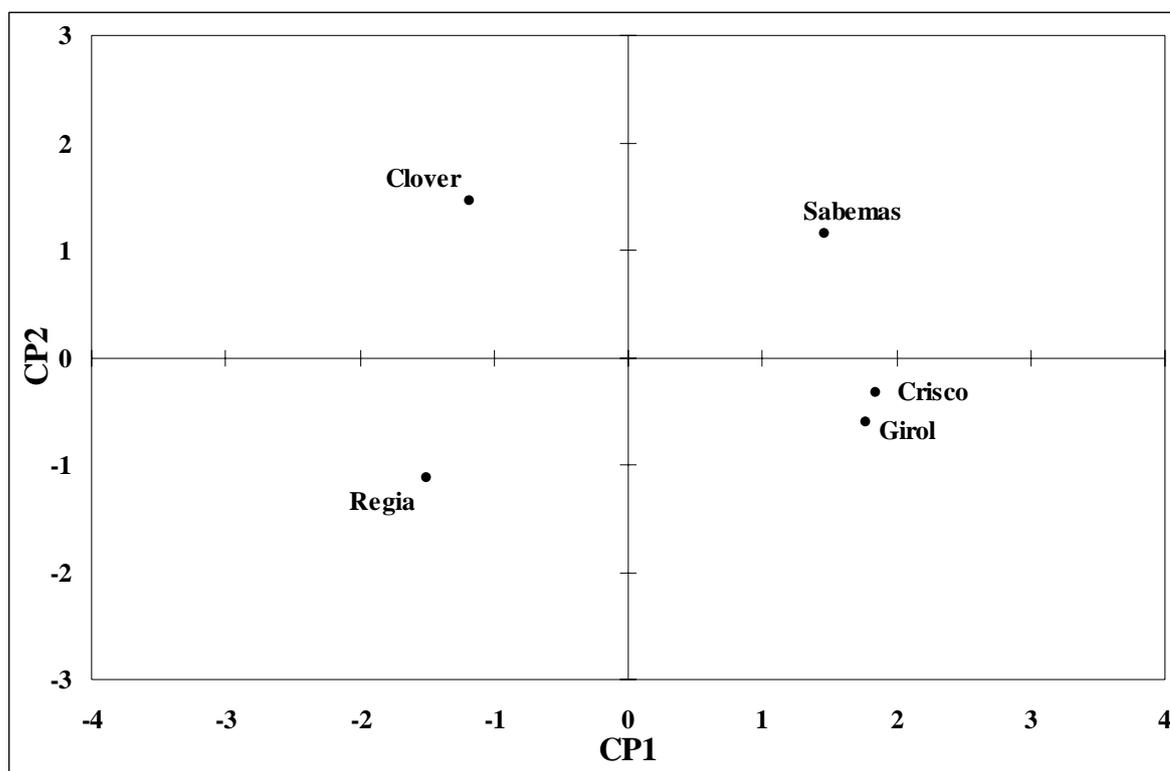
Por otra parte una observación somera de la Tabla VI.10., se observan menores asociaciones que en la Tabla VI.9., así los aceites Regia y Sabemas muestran una “perfecta” correlación negativa por lo que deberían estar en puntos opuestos o equidistantes entre si, mientras que los aceites Girol y Crisco, están menos correlacionados aunque es de esperarse que se asocien en un grupo.

La confirmación de los resultados obtenidos en las matrices de correlaciones, se realiza mediante el uso de herramientas multicomponentes entre las que se mencionan: el análisis de componentes principales y el análisis clasificatorio o de Clusters, las que nos ayudan visualmente a confirmar lo observado en las matrices de correlaciones.

En las Figuras VI.11. y VI.12. se muestran los resultados del análisis de componentes principales de las muestras diluidas y saponificadas respectivamente.



**Figura VI.11.** Gráfico del análisis de componentes principales de las muestras de aceites diluidas.



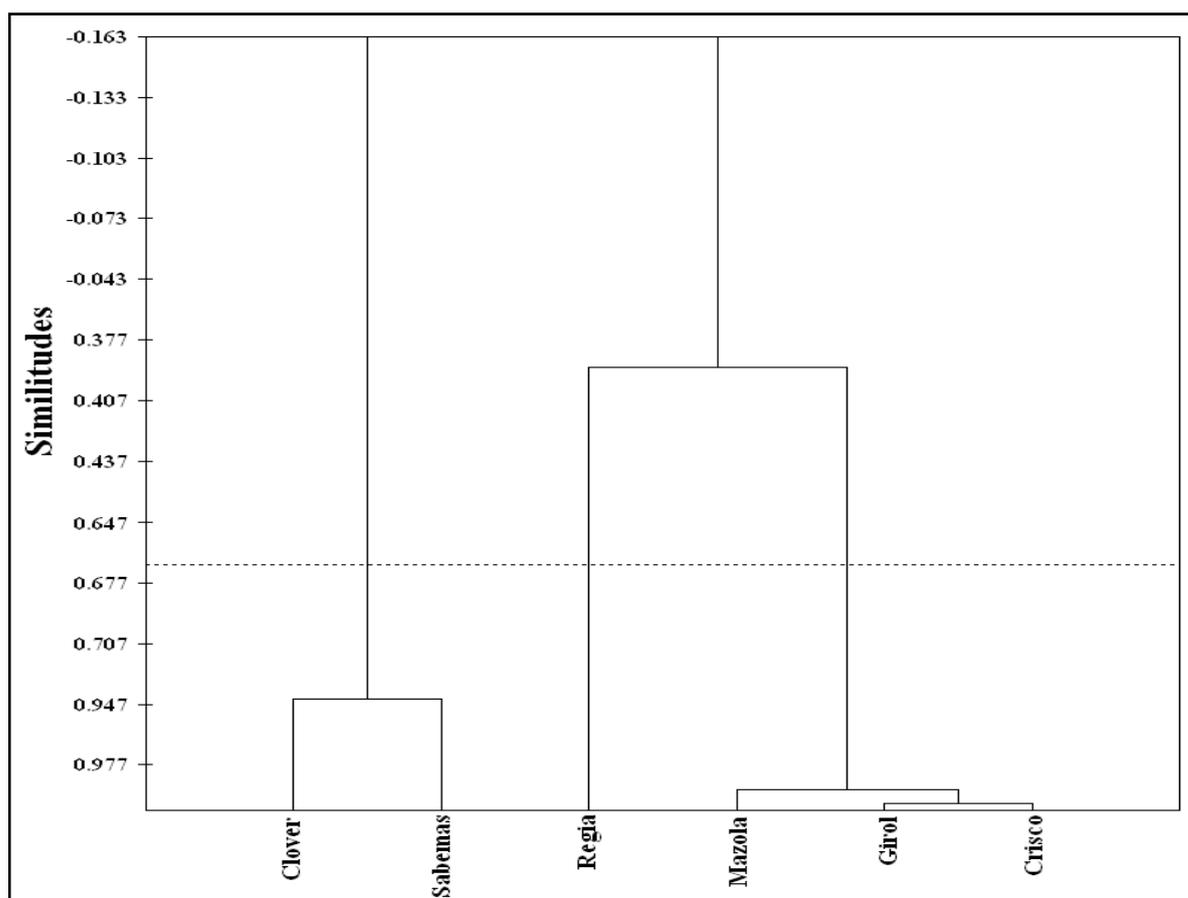
**Figura VI.12.** Gráfico del análisis de componentes principales de las muestras de aceites saponificadas.

De forma general podemos decir que el gráfico de análisis de componentes principales, nos ayuda a dilucidar asociaciones, agrupaciones y dependencias entre variables, aunque este análisis también puede ser usado para disminuir la “frondosidad” de las matrices de variables múltiples identificando asociaciones de variables que posteriormente pueden ser descartadas en posteriores análisis disminuyendo la complejidad del los análisis.

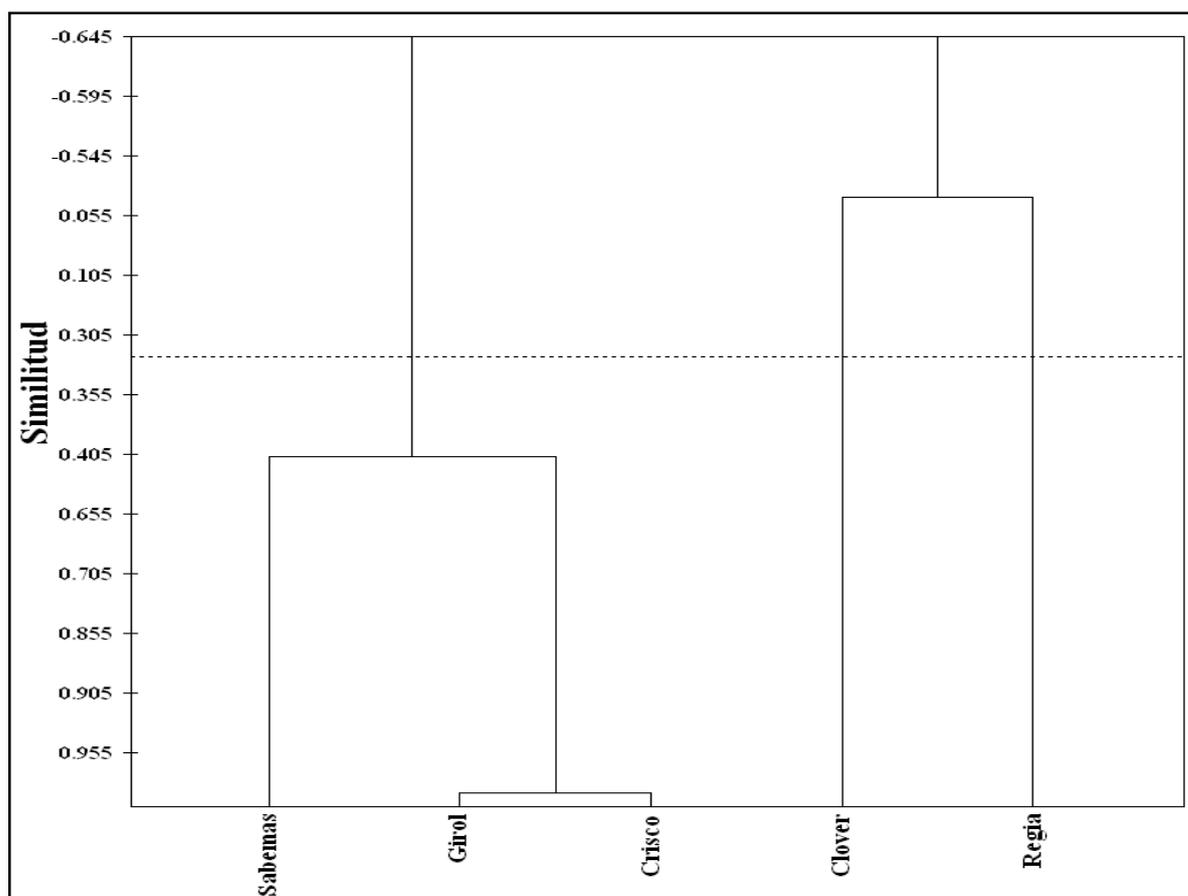
Si tomamos en cuenta las matrices de correlaciones anteriormente realizadas y consideramos los gráficos de ACP, podemos afirmar sin ninguna duda que estos son una confirmación de lo expuesto en las matrices, así en la Figura VI.11., se pueden observar asociaciones bastante evidentes entre los aceites: Mazola, Girol y Crisco, tal y como habíamos encontrado en las matrices de correlaciones, así mismo se observan menos asociaciones entre los aceites: Sabemas y Clover, igual como habíamos encontrado en la matriz de correlaciones y también vemos que el aceite Regia, no forma ninguna asociación con los otros aceites, lo que nos indica diferencia de su composición respecto a los otros.

Por otra parte, observamos con la Figura VI.12., ya que tal y como habíamos deducido de la matriz de correlaciones (ver Tabla VI.10.), solo los aceites Crisco y Girol, tienen relativas asociaciones, mientras que los aceites Regia y Sabemas, se encuentran equidistantes (correlación negativa), se puede observar así mismo que el aceite Clover no forma asociación alguna con los aceites de su conjunto, lo que puede indicar que el proceso de saponificación lo que le confiere características diferentes de los demás.

Finalmente es posible realizar una confirmación de lo encontrado en el análisis de componentes principales, aplicando un análisis de clasificación ascendente jerárquica mediante el cual es posible obtener un grafico de asociación denominado Dendograma, cuya función básica es establecer clasificaciones de variables en base a sus similitudes agrupándolas. En las figuras VI.13. y VI.14. se muestran los resultados del análisis clasificatorio ascendente jerárquico.



**Figura VI.13.** Grafico de clasificación ascendente jerárquica (dendograma) de las muestras de aceites diluidas.



**Figura VI.14.** Grafico de clasificación ascendente jerárquica (dendograma) de las muestras de aceites saponificadas.

Si relacionamos la matriz de correlaciones de la Tabla VI.9. con la Figura VI.13., podemos comprender las asociaciones o agrupaciones de los aceites de las muestras diluidas, así es comprensible que Girol y Crisco formen un grupo ya que su  $r = 0.997$  con un porcentaje de similitud mayor del 99%, así mismo debido a que Girol y Mazola tienen un  $r = 0.995$ , se forma a su vez otro grupo unido al anterior con un porcentaje de similitud mayor del 98%, este grupo conforma otro grupo ya que el Regia y Mazola tienen un  $r = 0.984$ , con un porcentaje de similitud mayor del 38%. Por otra parte se observa la conformación de otro grupo entre Clover y Sabemas debido a que su  $r = 0.945$ , pero este es independiente de los otros grupos debido a estos no se correlacionan ya sea parcial o totalmente con los otros aceites. Este grupo tiene un porcentaje de similitud mayor del 94%.

Si relacionamos la matriz de correlaciones de la Tabla VI.10. con la Figura VI.14., al igual que en el caso de las muestras diluidas, se observan asociaciones que se relacionan con los coeficientes de correlación, así el Girol forma grupo con el Crisco dado que su  $r = 0.988$  con un 96% de similitud, a su vez debido a que el Sabemas y el Crisco tienen un  $r = 0.669$ , forman otro grupo aunque con un 41% de similitud, por otra parte Clover y Regia, forman otro grupo aunque su  $r = 0.040$  siendo su porcentaje de similitud muy bajo, cercano al 0%.

Estos resultados contrastan evidentemente con los obtenidos en las muestras diluidas confirmando, lo que habíamos intuido en los análisis anteriores respecto a las diferencias entre las concentraciones encontradas debidas a los diferentes procesos de extracción del  $\alpha$ -tocoferol.

Finalmente, cabe reflexionar en el porque las muestras de aceites se asocian en grupos definidos, esto probablemente tiene relación con las concentraciones de  $\alpha$ -Tocoferol encontradas, lo cual es un importante paso para entender sus diferencias, sin embargo faltaría todavía realizar otros estudios para confirmar esta aseveración. Creemos que esto puede ser abordado en otros futuros trabajos monográficos que traten este aspecto con mayor amplitud.

## VII. CONCLUSIONES

Una vez finalizados los análisis de los resultados de la presente monografía, creemos oportuno plantear las siguientes conclusiones:

1. Se logró determinar el contenido de  $\alpha$ -Tocoferol en seis muestras de aceite vegetal comestible usando dos Pretratamiento de muestra: dilución y saponificación. Encontrándose que el proceso de dilución es el mas adecuado para este tipo de análisis ya que se aminora la pérdida de muestra, es más económico por la utilización de menos reactivos es mas rápido por que solamente se realiza en dos pasos mientras que el proceso de saponificación con lleva a mas gasto, es mas tediosos y los resultados no son tan diferentes a los del proceso de dilución.
2. Se logró establecer el aporte de vitamina E en una alícuota de 15 ml de las muestras de aceites tanto diluidas como saponificadas a la nutrición.
3. Se logró cuantificar el contenido de  $\alpha$ -tocoferol mediante la utilización de un modelo de regresión lineal simple con un valor de  $r^2 = 0.9995$  el cual nos indica la excelente bondad del ajuste de la recta al modelo lineal.
4. se lograron aplicar técnicas de análisis estadísticas a los resultados obtenidos.
  - El test de Bartlett nos indicó homogeneidad de las varianzas de las muestras diluidas y heterogeneidad de las saponificadas. A este respecto se determinó que el aceite Mazola se diferenciaba del resto de aceites lo que fue confirmado por el Test de Dixón. Al eliminar este aceite se recuperó la homogeneidad de las varianzas de las muestras saponificadas.
  - ANOVA, nos indicó diferencia entre las medias de los resultados tanto para las muestras diluidas como saponificadas.
  - El análisis de correlación nos indicó asociaciones entre los aceites de las muestras tanto diluidas como saponificadas.
  - El análisis de componentes principales corroboró los resultados obtenidos en el análisis de correlación, estableciendo grupos de aceites.

- El análisis clasificación ascendente jerárquico, produjo similares resultados a los obtenidos en el análisis de componentes principales y en el análisis de correlación, se logró visualizar agrupaciones de los aceites.

Estos resultados demuestran la validez de la utilidad de las herramientas de análisis estadístico en la comprensión de las diferencias o similitudes entre muestras.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Una vez finalizada la presente monografía y a la luz de los resultados, dificultades y logros creemos necesario realizar las siguientes recomendaciones:

1. Realizar la validación del método, en las condiciones del Laboratorio de Técnicas de Separación.
2. Extender el análisis a otros isómeros de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles).
3. Mejorar las condiciones ambientales del Laboratorio de Técnicas de Separación, que permita una mayor estabilidad para los analitos objetos de estudio.
4. Ampliar la cantidad de muestras de aceites a ser analizados, incluyendo los destinados a la exportación.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Vitamina: <http://es.wikipedia.org/wiki/vitamina>.
2. Vitamina: <http://www.zonadiet.com/nutricion/vitamina.htm>.
3. Elementos de Nutrición Humana EUNED Costa Rica .Zoila Rosa Marín Rodríguez Pág. 83.Consultado el 24 de junio de 2008.  
<http://books.google.com.ni/books?id=txKXD0mWGhoC&pg=PA83&dq=clasificacion+vitaminas&sig=VJkNX60TK4x32Wi7XZ-3iG0BkHw>].
4. Lic. Marcela Licata. Vitamina E: <http://wwwzonadiet.com/nutricion/vit-e.htm>
5. <http://es.wikipedia.org/wiki/Alfatocoferol>.
6. Fat-soluble vitamin in food-an analytical approach José de Paixao. Tania H Stamford. Departamento de nutrición ciencia de la salud. Univ. de Pernambuco 2004 Química Nova. V.27n1 Sao Pablo Ene-Feb 2004. [www.scielo.br/img/revista/qn/v27/n1/188182i.gif](http://www.scielo.br/img/revista/qn/v27/n1/188182i.gif)
7. Propiedades de la vitamina E: [http://www.botanical\\_online.com/MedicinalesvitaminaE.htm](http://www.botanical_online.com/MedicinalesvitaminaE.htm)
8. Tipos de aceites Denominaciones y definiciones de las distintas calidades de aceite de olivo orujo de oliva <http://www.anierac.com/tipos.htm>.
9. Cromatografía líquida de alta eficacia:  
[http://es.Wikipedia.org/wiki/cromatograf%C3%ADa\\_de\\_alta\\_resoluci%C3%B3n](http://es.Wikipedia.org/wiki/cromatograf%C3%ADa_de_alta_resoluci%C3%B3n).
10. Guillermo Ramis Ramos, María Celia García Álvarez-Coque. Quimiometría Carlos Seoane Prado, Editorial Síntesis, S.A. (Madrid España), Año 2001Pág.:41, 60,71

11. Prueba de homogeneidad de varianzas [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000352/lecciones\\_html/unidad2/leccion3/leccion-03-03-01-03.html](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000352/lecciones_html/unidad2/leccion3/leccion-03-03-01-03.html).

12. Análisis de varianza con un factor (ANOVA). [www.ub.es/aplica\\_infor/spss/cap4-7.htm](http://www.ub.es/aplica_infor/spss/cap4-7.htm).

13. correlación: [http://dieumsnh.qfb.umieh.mx/estadistica/correlación.htm](http://dieumsnh.qfb.umieh.mx/estadistica/correlacion.htm).

14. Análisis de componentes principales. [http://www.udc.edu/in3/emath/doos/componenes\\_principales.pdf](http://www.udc.edu/in3/emath/doos/componenes_principales.pdf).

15. Análisis Clasificadorio Ascendente. [www.anova/ra.es/.../curso%202004-05/Apuntes%20estadistica/Cluster.pdf](http://www.anova/ra.es/.../curso%202004-05/Apuntes%20estadistica/Cluster.pdf)

16. Esquema de dibujo de cromatografía: <http://img1143.imageshack.us/img143/786/hplcschfe7.gif>

## X. ANEXO



Fig. Aceites vegetales utilizados para este estudio



Fig. Equipo Cromatográfico utilizado para el análisis de  $\alpha$ -tocoferol.

**Tabla X.1** Áreas del estándar de  $\alpha$ -tocoferol en el rango de concentración utilizado para la recta de regresión.

<b>Nivel</b>	<b>Concentración (g/100 mL)</b>	<b>Área</b>
<b>1</b>	<b>22.00</b>	212236.54
		210755.99
		210363.08
<b>2</b>	<b>36.67</b>	361015.36
		367440.88
		363315.16
<b>3</b>	<b>58.68</b>	568359.91
		561461.67
		562317.20
<b>4</b>	<b>80.68</b>	762857.37
		761451.97
		760728.02
<b>5</b>	<b>102.69</b>	963166.08
		964108.18
		961166.88

**Tabla X.2** Áreas de las muestras diluidas de aceites que se analizaron y su respectivo factor de dilución (FD).

MUESTRA	áreas	FD
CLOVER	554806.02	100
	568703.36	
	571201.66	
GIROL	489330.86	100
	486736.07	
	492463.86	
REGIA	434951.71	100
	419292.86	
	426123.62	
SABEMAS	413074.24	100
	428082.11	
	425806.99	
MAZOLA	625373.38	55.56
	607587.58	
	660684.18	
CRISCO	298087.57	100
	282059.82	
	313962.32	

**Tabla X.3** Áreas de las muestras saponificadas de aceites y su factor de dilución (FD).

MUESTRA	áreas	FD
CLOVER	692284.60	50
	667619.52	
	602019.29	
GIROL	369326.31	50
	364853.93	
	383449.05	
REGIA	595682.69	50
	636955.82	
	604091.29	
SABEMAS	637953.12	50
	631068.69	
	636663.04	
MAZOLA	394079.16	50
	394238.58	
	388509.84	
CRISCO	601236.87	50
	587467.86	
	618068.27	

**Tabla X.4.** mg de  $\alpha$ -tocoferol en una cucharada (15 mL) de aceite

<b>Aceites</b>	<b>Diluidas (mg/cucharada)</b>	<b>Saponificadas (mg/cucharada)</b>
Clover	88.95	51.70
Girol	76.71	28.86
Regia	66.70	48.32
Sabemas	65.81	50.18
Mazola	55.40	30.47
Crisco	45.64	47.51



“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”