

Desarrollo y validación del método de oxidación ferrosa en xilenol naranja para la determinación de hidroperóxidos en aceite de girasol ozonizado

Goitybell Martínez Téllez y Maritza F. Díaz Gómez.

Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15 y 230, No. 1313, Apartado Postal 6412, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de septiembre de 2004. Aceptado: 15 de diciembre de 2004.

Palabras clave: aceite de girasol ozonizado, ozono, oxidación ferrosa en xilenol naranja, hidroperóxidos, validación.
Key words: ozonated sunflower oil, ozone, ferrous oxidation in xylene orange, hydroperoxides, validation.

RESUMEN. Se desarrolló y validó el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (OFX) para la determinación de hidroperóxidos totales (HPT) en aceite de girasol ozonizado, el cual puede ser utilizado en investigaciones y estudios de control de la calidad y de pre-formulación. Se analizaron muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada y a cada una le fue determinada la concentración de HPT empleando el método de OFX y se utilizó como método de referencia el índice de peróxidos (IP), establecido en la BP 2000. Se demostró la adecuada linealidad de los resultados de la técnica en el intervalo de concentraciones de IP estudiado de 48,4 a 501,7 mmol/kg (96,9 a 1 003,4 mmol-equiv/kg), con varianzas homogéneas, coeficientes de correlación y determinación mayores de 99 y 98 % respectivamente, coeficiente de variación de los factores de respuesta menor de 5 % ($CV_f = 4,8 \%$) e intercepto no significativamente diferente de 0. En el estudio de la exactitud, los recobrados obtenidos entre las concentraciones teóricas y experimentales (99,2 a 103,4 %) no mostraron diferencias significativas del 100 %. El método es preciso debido a que cumple con el ensayo de repetibilidad con coeficientes de variación no mayores de 4,2 %, además, no se encontraron diferencias significativas entre las medias ni las varianzas obtenidas por diferentes analistas en diferentes días. El excipiente empleado no interfiere significativamente en los resultados, lo que explica la especificidad del método, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las medias ni entre las varianzas de las determinaciones realizadas al aceite de girasol ozonizado y al aceite de girasol ozonizado con aceite de girasol (placebo). El método cumple con todos los parámetros para ser considerado validado para determinar HPT en aceite de girasol ozonizado.

ABSTRACT. Ferrous oxidation in xylene orange (OFX) method for total hydroperoxides (HPT) determination in ozonized sunflower oil was developed and validated. This method can be used in investigations and quality control and pre-formulation studies. Sunflower oil samples ozonated at different ozone dosage was analyzed and total hydroperoxides (HPT) concentration using OFX method was determined. Peroxides value (IP) established in BP, 2000 was used as standard method. Suitable linearity of the results of the technique was demonstrated in the IP interval concentration of 48,4 to 501,7 mmol/kg (96,9-1 003,4 mmol-equiv/kg), with homogeneous variances, correlation and determination coefficient greater than 99 and 98 % respectively, response factors variation coefficient lower than 5 % ($CV_f = 4,8 \%$) and no significantly different of "0" intercept. Recoveries obtained between theoretic and experimental concentration (99,2-103,4 %) in accuracy study, no showed a significant difference of 100 %. The method is precise because it satisfy repeatability assay, with variation coefficient not greater than 4,2 %, besides no significant differences were found in either the means or the variances obtained in different days, by different analysts. Excipient used no interferes significantly in the results, which explain the method specificity. No significant differences were found in either the means or the variances of determination realized to ozonized vegetable oil and ozonized vegetable oil with vegetable oil (placebo). The method satisfy all parameters for considerate it validated for HPT determination in ozonized vegetable oil.

INTRODUCCION

Desde tiempos remotos los aceites vegetales han sido utilizados como alimentos en la industria alimentaria, así como materia prima en la elaboración de medicamentos y cosméticos.^{1,2}

Una de las insuficiencias que presentan los aceites vegetales es su poca estabilidad con el tiempo, pues se oxidan con relativa facilidad.² Debido a esto, numerosas investigaciones se han realizado para el establecimiento de técnicas analíticas que permitan caracterizar y evaluar su calidad. Entre los métodos volumétricos más utilizados se encuentran los índices de peróxidos (IP), de acidez y de yodo.^{3,5} Otro método espectrofotométrico muy utilizado, para evaluar el grado de descomposición de los aceites comestibles es el de oxidación ferrosa en xilenol naranja, el cual permite medir de forma selectiva los hidroperóxidos totales formados en este sustrato.⁶

La interacción del ozono con los aceites vegetales genera la formación de una mezcla de compuestos químicos (ozónidos, hidroperóxidos, aldehídos, entre otros), a los cuales, se les atribuye el efecto germicida de este.⁷

Para la determinación del contenido de peróxidos en los aceites vegetales ozonizados se emplea comúnmente el método yodométrico.^{3,8} Este método presenta varias desventajas, una de ellas es la interferencia del oxígeno molecular en

la liberación de yodo, lo cual afecta los valores reales del índice de peróxidos.⁶ Otra desventaja es que el yoduro de potasio reacciona con los peróxidos u otros productos de la oxidación de los aceites, por lo que el índice obtenido es una aproximación del contenido de estos.⁹ Otra desventaja que afecta cuantitativamente el valor de este índice, es que en dos minutos de reacción, para oxidar el ión yoduro, no reaccionan todos los peróxidos presentes en la muestra ozonizada, como por ejemplo los peróxidos poliméricos y los de mayor peso molecular que los triglicéridos, componentes iniciales fundamentales en el aceite de girasol.¹⁰

Debido a que el método de IP mide de forma aproximada las especies peroxídicas formadas en los aceites vegetales ozonizados, ha sido objeto de este estudio evaluar la medición de HPT selectivamente, mediante el desarrollo y validación del método de oxidación ferrosa en xilenol naranja en el aceite de girasol ozonizado.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Sulfato ferroso de amonio hexahidratado, 1-propanol y ácido sulfúrico (ANALAR-BDH), Inglaterra. Diterbutilhidroxitolueno, xilenol naranja, metanol grado HPLC y terbutilhidroperóxido (SIGMA, Estados Unidos). Yoduro de potasio, tiosulfato de sodio, ácido acético, cloroformo, almidón, hidróxido de potasio, fenoftaleína, etanol y éter dietílico (Merck, Alemania).

Equipos

Se utilizó un ozonizador Trailigaz Labo, una balanza analítica Mettler y un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultrospec III.

Ozonización del aceite de girasol

En un reactor de borboteo se introdujeron 100 mL de aceite de girasol, calidad comestible (marca Ideal, Argentina). Se realizó la reacción de ozonización a una concentración inicial de ozono de 71,3 mg/L, con un flujo constante de 30 L/h y a 170 V, durante 2 h.

En el curso de la reacción de ozonización, fueron tomadas cinco muestras de 15 mL cada una, a las dosis de ozono aplicadas (DOA) siguientes: 4,7; 21,3; 30,9; 37,6 y 46,5 mg de ozono/g de muestra, a las cuales, se les determinó el IP.

Determinación del IP

Se pesaron $\approx 0,5$ g de muestra en balanza analítica y fueron disueltos en 30 mL de una mezcla de ácido acético-cloroformo 3:2. Posteriormente, se adicionaron 0,5 mL de una disolución acuosa saturada de yoduro de potasio. La mezcla fue incubada durante 2 min, mezclada con 30 mL de agua, valorada con tiosulfato de sodio 0,1 mol/L y agitada continuamente hasta la casi desaparición del color amarillo. Finalmente, se adicionaron 5 mL de disolución indicadora de almidón y se continuó valorando hasta la desaparición del color azul. El IP fue calculado de la expresión:

$$IP = \frac{100 v}{2 m} \quad (\text{mmol/kg})$$

donde:

v volumen en mililitros.

m masa en gramos de la muestra pesada.

El IP calculado se expresa en milimol de oxígeno activo por kilogramos de muestra.

Preparación del reactivo de OFX

El reactivo fue preparado por disolución del xilenol naranja y el sulfato ferroso de amonio en 250 mmol/L de ácido sulfúrico hasta una concentración final de 1 mmol/L para el xilenol naranja y 2,5 mmol/L para el sulfato ferroso de amonio. Se adicionó un volumen de este reactivo concentrado, a 9 volúmenes de metanol que contenían 4,4 mmol/L de BHT. Se obtuvo un reactivo de trabajo con 250 $\mu\text{mol/L}$ de sulfato ferroso de amonio, 100 $\mu\text{mol/L}$ de xilenol naranja, 2,5 mmol/L de ácido sulfúrico y 4 mmol/L de BHT en 90 % (v/v) con metanol.

Determinación de HPT

Se pesó una gota (10 a 50 mg) de cada una de las muestras con diferentes DOA y se disolvió en 10 mL de 1-propanol. De esta disolución, se tomó 0,1 mL y se disolvió en 1 mL de 1-propanol. De esta última disolución, se tomaron 50 μL y se mezclaron con el reactivo de OFX hasta completar 1 mL en tubos de microcentrífuga. Todas las mezclas anteriores fueron agitadas e incubadas durante una hora. La absorbancia del sobrenadante fue determinada en el espectrofotómetro a 560 nm.

Para el desarrollo de la curva de calibración y la determinación del coeficiente de extinción del reactivo, se disolvió el terbutilhidrope-

róxido en aceite de girasol a las concentraciones siguientes: 97, 466, 805, 1 113, 1 393 y 1 610 mmol/kg. Se realizó la determinación de HPT mediante el mismo procedimiento realizado a cada una de las muestras con diferentes DOA. La curva de calibración se realizó por duplicado.

Las concentraciones de las muestras con diferentes DOA fueron determinadas mediante la Ley de Lambert-Beer.¹¹

Validación de la metodología

Para evaluar la especificidad se contaminaron cinco muestras de aceite de girasol ozonizado con aceite de girasol sin ozonizar (placebo) al 1 %. Se determinó si existían diferencias significativas entre las varianzas (prueba de Fisher) y entre las medias (prueba de Student) para un 95 % de confianza, al comparar las determinaciones realizadas a las cinco muestras de aceite de girasol ozonizado (estudio de linealidad) y a estas muestras contaminadas con aceite de girasol.¹²

Para evaluar la linealidad se tomaron las cinco muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada. Se construyó la curva correspondiente, con las concentraciones de HPT obtenidas experimentalmente en el eje de las ordenadas y los IP en el eje de las abscisas. Se realizaron cinco réplicas para cada muestra. Se analizó la homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Cochran y Bartlett. La ecuación de regresión y los coeficientes de determinación (r^2) y correlación (r) se obtuvieron mediante el método de los mínimos cuadrados, en el que se consideró como criterio de linealidad $r^2 > 98$ % y $r > 99$ %, el coeficiente de variación de los factores de respuestas (CV_p) < 5 % y el intercepto con el eje y no significativamente diferente de "0" para un 95 % de confianza, mediante una prueba de Student.¹³

El estudio de exactitud se realizó mediante la adición de aceite de girasol ozonizado a cada una de las concentraciones de HPT estudiadas ($\approx 0,9$ g) a una cantidad fija de aceite de girasol virgen (0,1 g). Se realizaron cinco réplicas para cada una de las experiencias y se determinó el porcentaje de recobrado entre las concentraciones experimental y teórica de HPT.¹³

El procedimiento de repetibilidad fue realizado con cinco réplicas, para cada determinación de HPT a las muestras de aceite de girasol

ozonizado a diferentes DOA y el estudio de precisión intermedia se realizó con cinco réplicas por dos analistas diferentes en dos días diferentes. Como criterio de aceptación se consideró un coeficiente de variación (CV) menor de 4,2 % para la repetibilidad, que es el coeficiente máximo aceptado para cinco réplicas y un intervalo de aceptación de 95 a 105 %.¹² Para la precisión intermedia, se determinó si existían diferencias significativas entre las varianzas (prueba de Fisher) y entre las medias (prueba de Student) para un 95 % de confianza, de las determinaciones realizadas en diferentes días y por diferentes analistas.

Programa estadístico

Todos los resultados de los análisis de las muestras se procesaron mediante el programa estadístico de computación Statgraphics V. 5,0.¹⁴

RESULTADOS Y DISCUSION

De la reacción de ozonización del aceite de girasol, se obtuvieron cinco muestras a distintas DOA, a cada una de las cuales correspondió diferentes IP y HPT (Tabla 1), lo que coincidió con lo que ha sido reportado.^{15,16}

Las dos curvas de calibración graficadas:

$$y = 0,0672x - 0,0331$$

$$y = 0,0609x - 0,0012$$

permitieron calcular el coeficiente de extinción molar del reactivo de trabajo, cuyo valor es $6,4 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Fig. 1).

La técnica de determinación de HPT para aceites vegetales no se encuentra reportada en la British Pharmacopeia 2000,³ como metodología analítica para la evaluación del grado de oxidación de los aceites

vegetales. Es por ello que se procedió a su validación, para la determinación de los HPT en aceite de girasol ozonizado a diferentes DOA.

Especificidad

En el estudio de especificidad realizado, se comprobó que el excipiente utilizado (aceite de girasol) no interfiere en la determinación de HPT mediante el método OFX. Al comparar las determinaciones realizadas a las cinco muestras de aceite de girasol ozonizado y a las mues-

tras contaminadas con aceite de girasol, se comprobó que no existían diferencias significativas entre los resultados correspondientes. Los estadígrafos, F para las varianzas y t para las medias (Tabla 2), fueron en todos los casos menores que los tabulados para un 95 % de confianza ($F_{\text{tab.}} = 6,39$; $t_{\text{tab.}} = 2,78$), por lo que las varianzas y las medias se consideraron homogéneas para un mismo valor de concentración, por lo que el método tiene una buena especificidad.

Tabla 1. Indicadores determinados al aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicadas.

Dosis de ozono aplicada (mg/g)	Índice de peróxidos			Concentración de HPT		
	Media (mmol/kg)	DE	CV (%)	Media (mmol/kg)	DE	CV (%)
4,7	48,4	1,2	2,6	71,2	2,7	3,7
21,3	165,4	0,2	0,1	246,6	10,2	4,1
30,9	245,9	7,0	2,9	365,6	9,6	2,6
37,6	391,2	4,8	1,2	529,4	4,6	0,9
46,5	501,7	10,6	2,1	683,6	6,8	1,0

HPT Hidroperóxidos totales. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

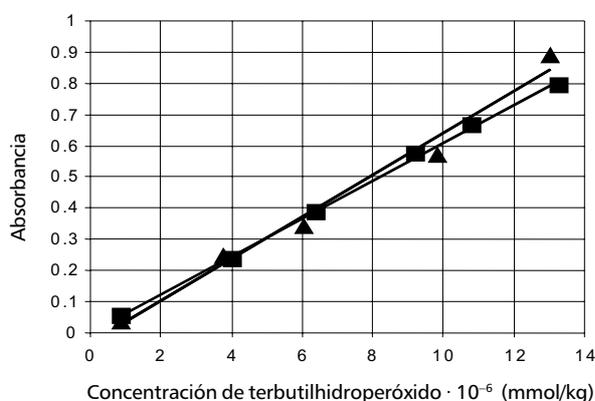


Fig. 1. Relación lineal obtenida entre el índice de peróxidos (IP) y la concentración de hidroperóxidos totales (HPT) en las muestras de aceite de girasol ozonizado.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la evaluación de la especificidad.

Dosis de ozono aplicada (mg/g)	Concentración de HPT						F _{exp.}	T _{exp.}
	Aceite de girasol ozonizado (AGO)			AGO contaminado con aceite de girasol				
	Media (mmol/kg)	DE	CV (%)	Media (mmol/kg)	DE	CV (%)		
4,7	71,2	2,7	3,7	70,7	1,9	2,6	0,14	0,36
21,3	246,6	10,2	4,1	251,0	9,6	3,8	0,49	0,70
30,9	365,6	9,6	2,6	363,1	13,8	3,8	0,12	0,33
37,6	529,4	4,6	0,9	528,9	12,3	2,3	0,01	0,08
46,5	683,6	6,8	1,0	687,4	23,3	3,4	0,12	0,35

HPT Hidroperóxidos totales. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

Linealidad

Se demostró la existencia de una relación lineal entre la determinación de los HPT mediante el método de OFX y la técnica IP establecida en la BP, 2000 (Fig. 2).³

Las varianzas fueron homogéneas, ya que los estadígrafos χ^2 en la prueba de Bartlett y G en la prueba de Cochran fueron menores que los valores tabulados para un 95 % de confianza ($\chi^2_{exp.} = 1,47$; $G_{exp.} = 0,42$). La ecuación de regresión obtenida fue:

$$y = 0,75 x + (-14,42).$$

Los coeficientes de correlación y determinación fueron superiores a los límites de aceptación $r = 99,84\%$ y $r^2 = 99,69\%$, lo que indicó una buena correlación entre los parámetros estudiados.

El CV_f fue menor de 5 % ($CV_f = 4,8$) y el método no presenta sesgo en el intervalo de concentraciones estudiado, ya que la t_{exp} asociada al intercepto ($t_{exp.} = 1,38$) es menor que la $t_{tab.}$ para un 95 % de confianza ($t_{tab.} = 2,78$), por lo cual resultó no significativamente diferente de 0 para un 95 % de confianza. Estos resultados permiten afirmar que el método presenta una buena linealidad.

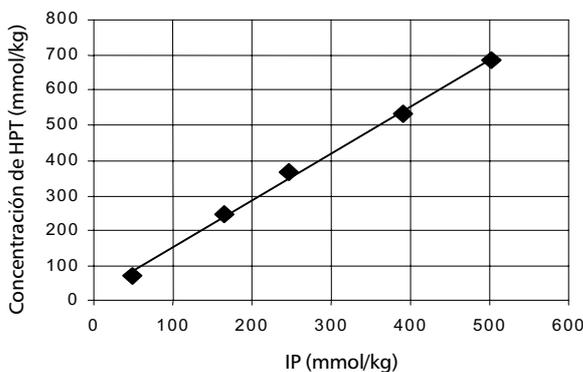


Fig. 2. Curvas obtenidas en la calibración del reactivo de OFX.

Exactitud

Para la evaluación de la exactitud se analizaron los recobrados obtenidos mediante una prueba de Student (Tabla 3). Se demostró que el método es exacto, ya que las $t_{exp.}$ fueron menores que la tabulada ($t_{tab.} = 2,78$) en todos los casos, por lo que los recobrados no defirieron estadísticamente del 100 %.

Precisión

En el estudio de repetibilidad no se obtuvieron CV superiores al límite de aceptación (4,2 %) en las concentraciones de HPT estudiadas (Tabla 4).

Se demostró mediante la comparación de las varianzas y la medias obtenidas en el estudio de precisión intermedia, que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos en diferentes días por distintos analistas, ya que las $F_{exp.}$ y las $t_{exp.}$ (Tabla 4) fueron inferiores a las tabuladas para un 95 % de confianza ($F_{tab.} = 6,39$, $t_{tab.} = 2,78$). Estos resultados demuestran que el método analítico es preciso.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja puede ser

Tabla 3. Resultados correspondientes al estudio de la exactitud.

Dosis de ozono aplicada (mg/g)	Concentración teórica de HPT (mmol/kg)	Concentración experimental de HPT			Recobrado (%)	$T_{exp.}$
		Media (mmol/kg)	DE	CV (%)		
4,7	63,8	63,3	1,7	2,7	99,2	0,69
21,3	221,2	228,7	7,3	3,2	103,4	2,30
30,9	328,6	329,3	9,9	3,0	100,2	0,16
37,6	472,2	470,0	11,6	2,5	99,5	0,42
46,5	615,4	617,9	20,1	3,25	100,4	0,28

HPT Hidroperóxidos totales. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

Tabla 4. Resultados obtenidos durante la evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia.

Dosis de ozono aplicada (mg/g)	Técnico 1 Día 1			Técnico 2 Día 2			$F_{exp.}$	$T_{exp.}$
	Concentración teórica de HPT							
	Media (mmol/kg)	DE	CV (%)	Media (mmol/kg)	DE	CV (%)		
4,7	71,2	2,7	3,7	71,7	3,0	4,1	0,09	0,29
21,3	246,6	10,2	4,1	249,9	10,1	4,0	0,26	0,51
30,9	365,6	9,6	2,6	368,4	15,4	4,2	0,12	0,34
37,6	529,4	4,6	0,9	528,3	20,3	3,8	0,01	0,12
46,5	683,6	6,8	1,0	672,7	23,7	3,5	0,98	0,99

HPT Hidroperóxidos totales. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

utilizado para la determinación de los hidroperóxidos totales en aceite de girasol ozonizado, en un intervalo del índice de peróxidos de 48,4 a 501,7 mmol/kg (96,9 a 1003,4 mmol-equiv/kg), con un elevado grado de confiabilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Gunstone F., Harwood I. and Padley F. The lipid handbook, 2nd Ed., Chapman and Hall, London, 101, 1994.
2. Vajda O. y Saenz T. Química de los alimentos, Capítulo IV, Tomo I, 1ra Ed., Editorial Científico Técnica, La Habana, 211-282, 1976.
3. British Pharmacopeia Peroxide Value, **Apéndices XF**, 2000.
4. British Pharmacopeia Acid Value, **Apéndices XB**, 2000.
5. British Pharmacopeia Iodine Value, **Apéndices XE**, 2000.
6. Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Birlouez- Aragon I. and Wolff S. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xilenol orange assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **43**, 17, 1995.
7. Lezcano I., Núñez N., Gutiérrez M., Molerio M., Regüeyeros J. and Díaz W. Actividad *in vitro* del Aceite de Girasol Ozonizado (OLEOZON®) frente a diferentes especies bacterianas. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **27**, 46, 1996.
8. Hicks M. and Gebicki J. Spectrophotometric method for determination of lipid Hydroperoxides. **Anal. Biochem.**, **99**, 249, 1979.
9. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps II, D.13. 1964.
10. Arteaga M., Díaz M., Martínez G. Aceite de teobroma ozonizado para uso terapéutico. Tesis de diploma. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana, Cuba, 2004.
11. Thielmann K. Principios de Metodología en Bioquímica Clínica, Editorial Organismos, Instituto Cubano del Libro, Ciudad de La Habana, 48-49, 1973.
12. Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J. y Vicente, L. Validación de métodos analíticos. Sección Catalana de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 1, 1989.
13. Camacho M., Torres A., Gil M., Obregón M. and Ruz V. Validation of Analytical Methods for Finished Pharmaceutical Products. **STP Pharma Pratiques**, **3**, 1, 1993.
14. STATGRAPHICS version 5.0. Statistical Graphic Corporation, EUA. 2000.
15. Díaz M., Álvarez I., Vélez H., Hernández F., Ledea O. y Moleiro J. ¹H NMR studies of the ozonation of methyl oleate. **Boletín Sociedad Chilena de Química**, **42**, 349, 1997.
16. Hernández R., Martínez G., Díaz M. Aspectos Químico Físicos del Aceite de Girasol Ozonizado. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **35**, 159. 2004.

CORROSIÓN Y PROTECCIÓN

**Grupo de Corrosión e Ingeniería de Materiales,
Facultad de Ingeniería Química,
Instituto Superior Politécnico "José A. Echeverría".**



Calle 114 y 127, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.
Tel.: (537) 204 0745. Fax: 204 0641. email: ggei@ceta.inf.cu
rigo@quimica.cujae.edu.cu jdom@quimica.cujae.edu.cu

CONSULTORÍAS, ASESORAMIENTO Y SERVICIOS:

- Diseño y evaluación de sistemas de protección catódica: estudios de campo, proyectos, equipos y montaje.
- Selección, evaluación y aplicación de inhibidores de corrosión en sistemas industriales.
- Preparación de superficies metálicas con fines anticorrosivos y decorativos.
- Electrodeposición de metales y tratamiento de sus residuos.
- Diseño mecánico y anticorrosivo de equipos de la industria química.
- Problemas de corrosión en estructuras de hormigón armado.
- Deterioro y protección de instalaciones industriales diversas: petróleo y gas, energética, alimentaria, médico-farmacéutica y otras.
- Corrosión y protección de sistemas de enfriamiento, climatización, suministro de agua y vapor en la industria o en instalaciones de servicios turísticos, hospitalarios y similares.

POSTGRADOS:

- Cursos, diplomados, maestrías y doctorados a solicitud que abarcan desde temáticas básicas de Corrosión y Protección hasta temas específicos para la preparación dirigida del personal hacia las particularidades productivas de sus Centros e instituciones respectivos.

Vasta experiencia profesional avalada por más de 30 años de trabajo.