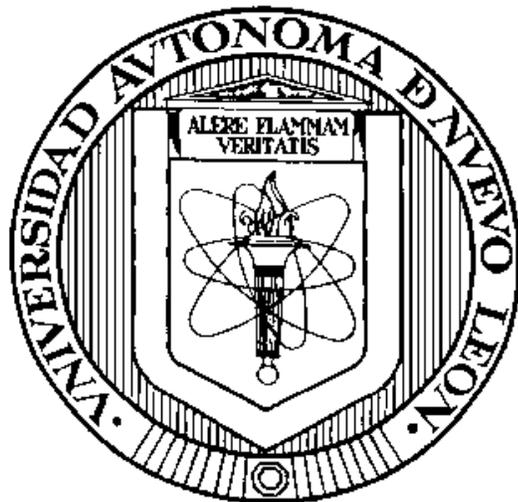


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Evaluación del uso de mezclas eutécticas en la  
microextracción líquido-líquido de antioxidantes fenólicos sintéticos.**

Por:

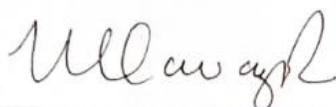
Q.C.B. Paola Cobos Cervantes

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA

JULIO DE 2024

**Evaluación del uso de mezclas eutécticas en la  
microextracción líquido-líquido de antioxidantes fenólicos sintéticos.**

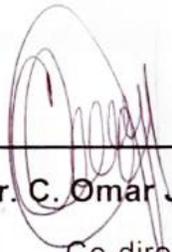
Aprobación de tesis:



---

**Dra. C. Norma Cavazos Rocha**

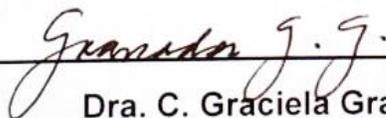
Director de tesis



---

**Dr. C. Omar J. Portillo Castillo**

Co-director de tesis



---

**Dra. C. Graciela Granados Guzmán**

Comisión de tesis



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

Subdirector de Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***Dios:***

Todo mi camino ha estado forjado por tu amor y tus palabras. Agradezco y comparto cada obstáculo y victoria por la cual he pasado a lo largo de estos dos años.

### ***Esdras:***

Por siempre demostrarme que puedo ser mi mejor versión, por entenderme y acompañarme en mis momentos más difíciles.

### ***Mis padres:***

Por ser un pilar muy importante en mi vida, por su apoyo y amor incondicional y por siempre haber creído en mí.

### ***Comisión de tesis:***

Dra. Norma, gracias por siempre haber tenido la disposición de apoyarme, por haberme recibido como becaria en la licenciatura y brindarme todos sus conocimientos.

Dr. Omar por siempre estar al pendiente de mí, por ayudarme a crecer como investigadora, compartir su conocimiento, tiempo y entusiasmo conmigo. Por haber creído en mí y haber visto potencial en mí.

Dra. Graciela, por siempre ser tan amable y generosa. Por todos los consejos y observaciones que me brindaba.

## ÍNDICE

Capítulo	Nombre	Página
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	1.1 Aceite vegetal comestible.....	1
	1.2 Antioxidantes fenólicos sintéticos.....	4
	1.2.1 Análisis de antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites comestibles.....	8
	1.3 Química verde.....	10
	1.4 Técnicas de preparación de muestra.....	13
	1.5 Técnicas de microextracción.....	14
	1.5.1 Microextracción líquido-líquido.....	15
	1.6 Disolventes eutécticos profundos.....	16
	1.7 Antecedentes.....	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
	5.1 Reactivos.....	26
	5.2 Equipos.....	28
	5.3 Materiales.....	29
	5.4 Métodos.....	31
	5.4.1 Preparación y caracterización de los DES.....	31
	5.4.2 Desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.....	33
	5.4.3 Validación del sistema cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.....	34
	5.4.3.1 Evaluación del efecto de la presencia de los DES en la separación y cuantificación de los analitos.....	37
	5.4.4 Optimización de las condiciones de extracción de TBHQ, BHT y BHA por la técnica de LLME basada en DES en aceite vegetal.....	38

5.4.4.1	Selección de la matriz.....	38
5.4.4.2	Tamizaje de las condiciones de extracción..	39
5.4.4.3	Optimización de las condiciones de extracción.....	47
5.4.5	Evaluación del desempeño del método de extracción propuesto en muestras de aceite vegetal.....	49
5.4.5.1	Validación del método de microextracción líquido-líquido.....	49
5.4.5.2	Evaluación del desempeño analítico del método propuesto.....	52
5.4.5.3	Evaluación ecológica del método propuesto.....	54
5.4.5.4	Aplicación del método de microextracción propuesto.....	54
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>56</b>
6.1	Preparación y caracterización de los DES.....	56
6.2	Desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.....	60
6.3	Validación del sistema cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.....	63
6.3.1	Evaluación del efecto de la presencia de los DES en la separación y cuantificación de los analitos.....	66
6.4	Optimización de las condiciones de extracción de TBHQ, BHT y BHA por la técnica de LLME basada en DES en aceite vegetal.....	70
6.4.1	Selección de la matriz.....	70
6.4.2	Tamizaje de las condiciones de extracción.....	71
6.4.3	Optimización de las condiciones de extracción.....	81
6.5	Evaluación del desempeño del método de extracción propuesto en muestras de aceite vegetal.....	85
6.5.1	Validación del método de microextracción líquido-líquido.....	85
6.5.2	Evaluación del desempeño analítico del método propuesto.....	90
6.5.3	Evaluación ecológica del método propuesto.....	94
6.5.4	Aplicación del método de microextracción propuesto.....	98

<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>101</b>
7.1	Preparación y caracterización de los DES.....	101
7.2	Desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.....	105
7.3	Validación del sistema cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.....	107
7.4	Optimización de las condiciones de extracción de TBHQ, BHT y BHA por la técnica de LLME basada en DES en aceite vegetal.....	110
7.5	Evaluación del desempeño analítico del método de extracción propuesto.....	119
7.6	Evaluación ecológica del método propuesto.....	132
7.7	Aplicación del método de microextracción propuesto.....	138
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>140</b>
8.1	Conclusiones.....	140
8.2	Perspectivas.....	142
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>143</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>165</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
<b>I</b>	Propiedades fisicoquímicas de los antioxidantes fenólicos sintéticos.	6
<b>II</b>	Condiciones de extracción utilizadas para la selección de la matriz.	39
<b>III</b>	Variables incluidas en el diseño de experimentos en la etapa de tamizaje.	40
<b>IV</b>	Diseño de experimentos factorial fraccionado utilizado en la etapa de tamizaje.	42
<b>V</b>	Variables incluidas en el diseño de experimentos en la etapa de optimización.	48
<b>VI</b>	Diseño de experimentos simplex de múltiple descarte para la utilizado en la etapa de optimización.	48
<b>VII</b>	Condiciones óptimas para el análisis del TBHQ.	49
<b>VIII</b>	Información de las muestras analizadas con el método propuesto.	55
<b>IX</b>	Resumen de los resultados obtenidos en el desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHA y BHT.	61
<b>X</b>	Condiciones óptimas para el análisis del TBHQ, BHA y BHT.	62
<b>XI</b>	Resultados de la validación del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de TBHQ, BHA y BHT.	64

	Análisis del TBHQ en presencia de los DES compuestos por	
<b>XII</b>	cloruro de colina y urea (1:2) y cloruro de colina y glicerol (1:2).	67
	Análisis del BHA en presencia de los DES compuestos por	
<b>XIII</b>	cloruro de colina y urea (1:2) y cloruro de colina y glicerol (1:2).	68
	Análisis del BHT en presencia de los DES compuestos por	
<b>XIV</b>	cloruro de colina y urea (1:2) y cloruro de colina y glicerol (1:2).	69
<b>XV</b>	Condiciones óptimas del método de LLME para la extracción de TBHQ en aceite vegetal comestible.	8
<b>XVI</b>	Resultados de la validación de la curva de calibración en fase móvil para TBHQ.	86
<b>XVII</b>	Resultados de la validación de la curva de calibración en hexano después del proceso de extracción para TBHQ.	87
<b>XVIII</b>	Resultados de la validación de la curva de calibración en matriz después del proceso de extracción para TBHQ.	88
<b>XIX</b>	Resultados de la evaluación del efecto matriz.	89
<b>XX</b>	Resultados correspondientes a la precisión del desempeño analítico del método desarrollado.	91
<b>XXI</b>	Resultados correspondientes a la exactitud del desempeño analítico del método desarrollado.	92

<b>XXII</b>	Evaluación ecológica del método de extracción propuesto y comparación con otros métodos reportados.	94
<b>XXIII</b>	Resultados obtenidos del TBHQ en el análisis de muestras reales.	99
<b>XXIV</b>	Comparación del método propuesto con otros métodos.	129
<b>XXV</b>	Condiciones cromatográficas de los métodos evaluados para la determinación de TBHQ, BHA y BHT.	166

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Mecanismo de oxidación de lípidos.	3
2	Mecanismo de acción de los antioxidantes.	5
3	Estructura química de antioxidantes fenólicos alimentarios de origen sintético.	6
4	Comparación de los 12 principios de GAC y los 10 principios de GSP (Adaptado de Kokosa & Przyjazny, 2022).	12
5	Proceso general de la microextracción líquido-líquido.	16
6	Estructura química de algunos aceptores de enlaces de hidrógeno y donantes de enlaces de hidrógeno utilizados para la preparación de disolventes eutécticos profundos.	17
7	Diagrama general de fases sólido-líquido de una mezcla eutéctica.	19
8	Espectros infrarrojo de: a) cloruro de colina, b) urea, c) DES compuesto de cloruro de colina y urea (1:2).	58
9	Espectros infrarrojo de: a) cloruro de colina, b) glicerol, c) DES compuesto de cloruro de colina y glicerol (1:2).	59
10	Cromatograma de una solución en mezcla de TBHQ, BHA y BHT (60 mg/L en fase móvil compuesta por etanol y una solución acuosa de ácido acético 0.1%, 45:55) bajo las condiciones de la Tabla XIII.	62

	Curvas de calibración de los antioxidantes fenólicos sintéticos TBHQ, BHA y BHT bajo las condiciones del método de la Tabla XIII.	65
<b>11</b>		
	Cromatograma obtenido bajo las condiciones mostradas en la Tabla II utilizando con fase extractantes el DES compuesto por ChCl:Gly(1:2).	70
<b>12</b>		
	Cromatograma obtenido bajo las condiciones mostradas en la Tabla II utilizando con fase extractantes el DES compuesto por ChCl:Ur(1:2).	71
<b>13</b>		
<b>14</b>	Resumen de ajuste del modelo.	73
	Gráficos de coeficiente para el efecto estandarizado de las variables evaluados en el diseño factorial fraccionado para el TBHQ.	76
<b>15</b>		
	Gráficos de coeficiente para el efecto estandarizado de las variables evaluados en el diseño factorial fraccionado para el BHA.	77
<b>16</b>		
	Gráficos de coeficiente para el efecto estandarizado de las variables evaluados en el diseño factorial fraccionado para el BHT.	78
<b>17</b>		
	Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de tipo de DES, proporción de agua, volumen de fase extractante, tiempo de agitación y método de agitación para el TBHQ.	79
<b>18</b>		

<b>19</b>	Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de tipo de DES, proporción de agua, volumen de fase extractante, tiempo de agitación y método de agitación para el BHA.	80
<b>20</b>	Resultados obtenidos del diseño simplex de múltiple para la optimización de la extracción.	82
<b>21</b>	Protocolo de microextracción con las condiciones óptimas	84
<b>22</b>	Cromatograma obtenido para una solución en mezcla de los analitos a 75 mg/L en fase móvil (etanol - ácido acético 0.1%, 60:40) bajo las condiciones de la Tabla VII.	85
<b>23</b>	Curva de calibración en fase móvil para TBHQ.	86
<b>24</b>	Curva de calibración en hexano para el TBHQ.	87
<b>25</b>	Curva de calibración en matriz para TBHQ.	88
<b>26</b>	Curvas de calibración en hexano y en matriz después de la extracción bajo las condiciones óptimas.	90
<b>27</b>	Curvas de calibración en fase móvil sin extracción (azul) y en matriz después de la extracción (rojo).	93
<b>28</b>	Cromatogramas obtenidos de la extracción de muestras de aceite vegetal comerciales de las marcas: a) Mazola (maíz); b) Vita Premium (soya); c) Kartamus (mezcla de canola, soya, girasol y cártamo).	100

<b>29</b>	Cromatograma obtenido para una solución de TBHQ (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico 0.1%,30:70) con el método 1.	169
<b>30</b>	Cromatograma obtenido para una solución de BHA (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 30:70) con el método 1.	170
<b>31</b>	Cromatograma obtenido para una solución de BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 30:70) con el método 1.	170
<b>32</b>	Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 2.	171
<b>33</b>	Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 3.	171
<b>34</b>	Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 4.	172
<b>35</b>	Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 5.	172

- Cromatograma obtenido para una solución mezcla de  
**36** TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por 173  
etanol: ácido acético, 45:55) con el método 6.
- Cromatograma obtenido para una solución mezcla de  
**37** TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por 173  
etanol: ácido acético, 45:55) con el método 7.
- Cromatograma obtenido para una solución mezcla de  
**38** TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por 174  
etanol: ácido acético, 45:55) con el método 8.
- Cromatograma obtenido para una solución mezcla de  
**39** TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por 175  
etanol: ácido acético, 45:55) con el método 9.
- Cromatograma obtenido para una solución mezcla de  
**40** TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por 175  
etanol: ácido acético, 45:55) con el método 10.
- Cromatograma obtenido para una solución mezcla de  
**41** TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por 176  
etanol: ácido acético, 45:55) con el método 11.
- Cromatograma obtenido para una solución mezcla de  
**42** TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por 176  
etanol: ácido acético, 45:55) con el método 12.

<b>43</b>	Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 13.	177
<b>44</b>	Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de aceite vegetal comestible marca Mazola	178
<b>45</b>	Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de aceite vegetal comestible marca Vita Premium	178
<b>46</b>	Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de aceite vegetal comestible marca Kartamus	179

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
BHA	Butirato de hidroxianisol
BHT	Butirato de hidroxitolueno
TBHQ	Terbutilhidroquinona
NIH	Institutos Nacionales de Salud
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CG	Cromatografía de gases
GAC	Química analítica verde
GSP	Preparación de muestras verdes
SDME	Microextracción en gota
LLME	Extracción líquido-líquido
SPME	Microextracción en fase sólida
MEPS	Microextracción con sorbente empacado
DES	Disolvente eutéctico profundo
HBD	Donador de enlaces de hidrógeno
HBA	Aceptor de enlaces de hidrógeno
ChCl	Cloruro de colina
AOAC	Asociación Oficiales de Químicos Agrícolas

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Aceite vegetal comestible**

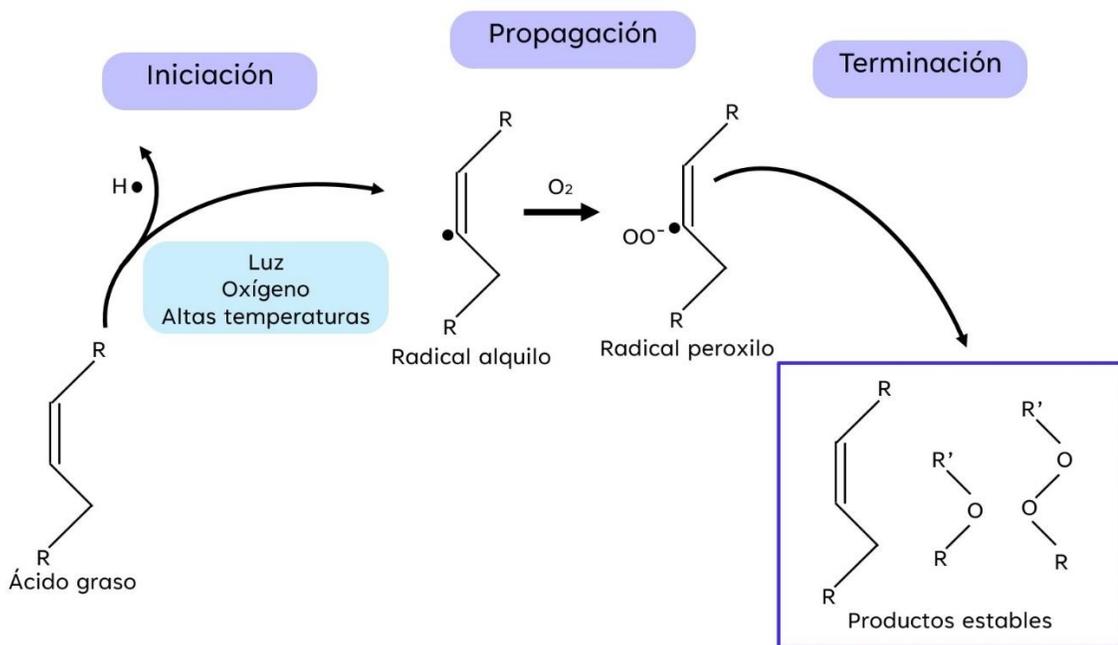
Un aceite vegetal comestible se define como un aceite desodorizado que puede contener uno o más aceites aptos para consumo, obtenido por extracción con disolventes, extracción mecánica o por cualquier otro procedimiento, en cuya composición predominan triacilgliceroles y que proviene de plantas oleaginosas o de sus variedades biotecnológicas aprobadas para alimentación humana (NMX-F-223-SCFI-2011).

Además de los triacilglicéridos, los aceites vegetales comestibles contienen en menores cantidades compuestos como diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos libres, hidrocarburos, fitoesteroles, fosfolípidos (Gunstone, 2013) y antioxidantes intrínsecos, como los tocoles y carotenos (Cheung et al., 2007). Sin embargo, a pesar de la presencia de antioxidantes en este alimento, no son suficientes para mantener la integridad de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite, los cuales se exponen a altas temperaturas y al oxígeno durante la cocción y almacenamiento haciéndolos susceptibles a la oxidación (Cheung et al., 2007).

Además, La oxidación se ha considerado, a lo largo del tiempo, como la principal causa del deterioro de un aceite vegetal comestible que afecta no solo la calidad organoléptica que puede percibir el consumidor por los malos olores y sabores debido a la ranciedad producida, sino también la calidad nutricional del alimento. Asimismo, se ha convertido en un problema de gran importancia por la disminución de la vida de anaquel por la ranciedad producida, ya que provoca pérdidas económicas (Yanishlieva & Marinova, 2001).

La ruta de oxidación en los aceites se lleva a cabo en los sitios de doble enlace de las moléculas de triacilglicerol (Yanishlieva & Marinova, 2001), donde está implicado un mecanismo de cadena de radicales libres a través de tres etapas, una de iniciación, otra de propagación y, por último, una de terminación.

Los radicales producidos en el paso de iniciación reaccionan con los ácidos grasos insaturados, lo que ocasiona que se extraiga un átomo de hidrógeno de un sitio que requiere la menor energía, es decir la posición alílica o dialílica. Esto sucede durante el paso de propagación. El suceso de las primeras dos etapas produce una reacción en cadena que no se detiene hasta que ocurre una reacción de terminación como puede verse en la Figura 1 (Berdahl et al., 2010).



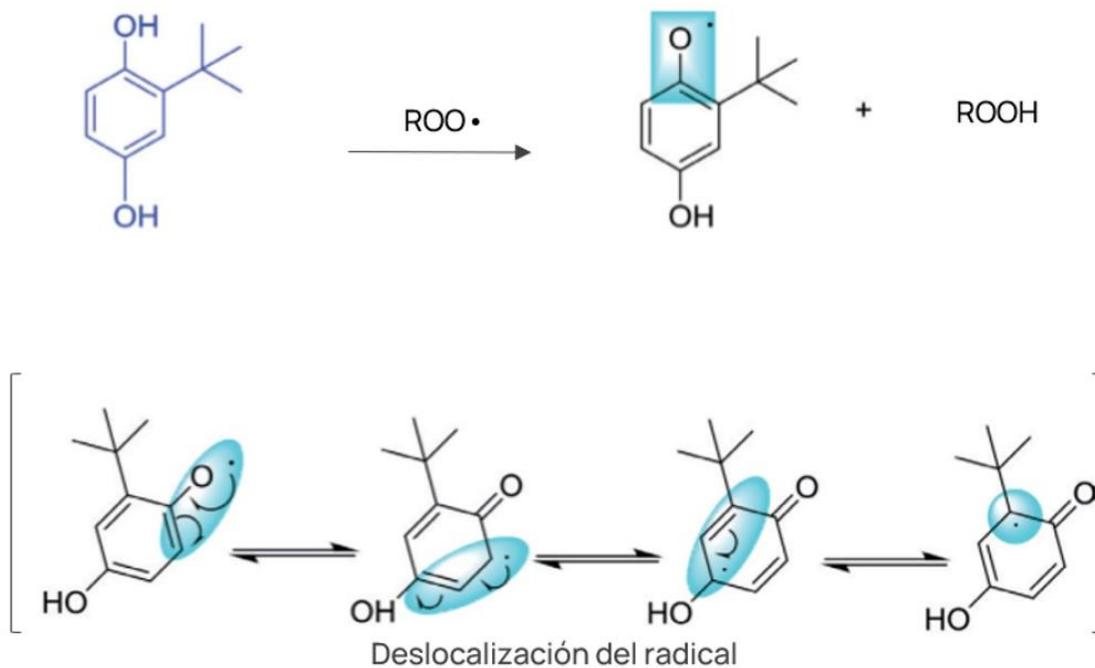
**Figura 1.** Mecanismo de oxidación de lípidos.

## 1.2 Antioxidantes fenólicos sintéticos

Para poder detener la oxidación de los ácidos grasos insaturados y mantener la seguridad adecuada en los aceites vegetales comestibles, es necesario el uso de antioxidantes como aditivos, ya sean sintéticos o naturales (Bera et al., 2006).

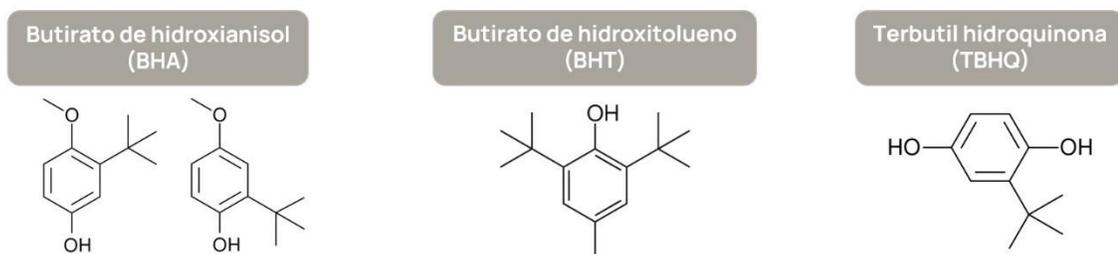
Un ejemplo de antioxidantes sintéticos son los antioxidantes fenólicos sintéticos, los cuales son los más utilizados en alimentos para detener los procesos de oxidación de lípidos (Shahidi, 2000). Se ha demostrado que el uso de mezclas de antioxidantes fenólicos sintéticos es más efectivo que su uso individual a la misma concentración. Por esta razón la práctica común consiste en añadir a los alimentos mezclas de antioxidantes (Badui Dergal, 2006).

El mecanismo de los antioxidantes durante los procesos de oxidación se basa en la interrupción de la cadena de radicales libres de reacciones oxidativas. Esto se logra a través de la donación de un radical de un átomo de hidrógeno, del hidroxilo fenólico unido a los anillos aromáticos. Posteriormente, los nuevos radicales formados se vuelven estables y no inician ni propagan una mayor oxidación de los lípidos, como puede verse en la Figura 2 (Waisundara, 2021).



**Figura 2.** Mecanismo de acción de los antioxidantes

Dentro de los compuestos químicos llamados antioxidantes fenólicos sintéticos, podemos encontrar al butirato de hidroxianisol (BHA), el butirato de hidroxitolueno (BHT) y la terbutilhidroquinona (TBHQ) (Saad et al., 2007). En la Figura 3, se muestran las estructuras químicas de los compuestos antes mencionados.



**Figura 3.** Estructura química de antioxidantes fenólicos alimentarios de origen sintético.

En la Tabla I se presentan algunas de las propiedades fisicoquímicas del BHA, BHT y del TBHQ, que son importantes para la determinación analítica de estos compuestos.

**Tabla I.** Propiedades fisicoquímicas de los antioxidantes fenólicos sintéticos.

Propiedad fisicoquímica	Compuesto químico		
	TBHQ	BHA	BHT
<b>Peso molecular</b>	360.50 g/mol	220.35 g/mol	166.22 g/mol
<b>LogP</b>	3.78	5.30	2.8
<b>Solubilidad</b>	213 mg/L (Agua, 25 °C)	0.0006 mg/mL (Agua, 25 °C)	2000 mg/L (Agua, 30 °C)
<b>pKa</b>	10.60	11.60	9.94

\*[Drug Bank, 2022; Australian Government, 2022; NIH, 2023]

A pesar de la destacable función de estos compuestos, hay una creciente preocupación por los posibles efectos negativos que provocan, principalmente su asociación al desarrollo de cáncer. Hay evidencia de que el BHA produce tumores en la parte anterior del estómago de roedores después de una exposición dietética crónica mayor a 55 mg/kg/día (Felter et al., 2021). En cuanto al BHT, se ha encontrado que su administración en ratones causa lesión pulmonar y una respuesta inflamatoria posterior y, cuando se administra de forma crónica, aumenta la multiplicidad de tumores pulmonares (Alison K. Bauer, 2001). Por último, se ha observado que el TBHQ produce tumores gástricos cuando se administran en animales dosis altas durante un periodo prolongado (X. Xu et al., 2021).

Tal es la preocupación por los efectos negativos de estos compuestos que se ha limitado su uso en aplicaciones alimentarias, permaneciendo como prohibidos en Canadá, Japón y algunos países europeos (Shahidi, 2000).

Lo anterior ha llevado a diversas instituciones regulatorias a establecer límites de exposición seguros en los alimentos. Por ejemplo, el Codex Alimentarius (1995), ha establecido un máximo permitido de 200 mg/kg para el BHA, BHT y TBQH de forma individual en aceite vegetal comestible. En el caso de que se utilicen múltiples antioxidantes sintéticos en combinación el máximo permitido es de 200 mg/kg.

En México, la Norma Mexicana NMX-F-223-SCFI-2011 que establece las especificaciones para aceites vegetales comestibles, esta normatividad permite un porcentaje máximo de BHA de 0.01%, y de 0.02% para Bot y TBHQ. Cuando se utilicen múltiples antioxidantes combinados, el límite permitido es de 0.02%.

Además, en la norma oficial mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010 se indica que en la etiqueta de los productos preenvasados cuya comercialización sea en forma individual, debe figurar una lista de ingredientes donde debe incluirse todo aditivo empleado en cantidad notable o suficiente para desempeñar en él una función tecnológica.

#### 1.2.1 Análisis de antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites comestibles.

Es evidente que es necesario un control de calidad en aceites con el propósito de asegurar que la presencia y cantidad de los compuestos añadidos, tales como los antioxidantes fenólicos sintéticos, cumplen con los límites permitidos y seguros.

Debido a la complejidad de la matriz, es necesario realizar un tratamiento a las muestras de aceite vegetal comestible previo a su análisis. Para la

determinación de antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites se han desarrollado diversas metodologías. Las técnicas más comunes para aislar los antioxidantes fenólicos sintéticos se basan en la extracción directa con disolventes orgánicos (Kim et al., 2016) o la extracción en fase sólida (Mateos et al., 2001; Wang et al., 2022).

Por otra parte, para el análisis de las muestras, se incluyen técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV-Visible (CLAR-UV-Vis) (Perrin & Meyer, 2003; Rashidi et al., 2016; S. Xu et al., 2016), cromatografía de gases (CG) con detección de ionización de llama (CG-FID) (Sin et al., 2006; Yang et al., 2002), y técnicas electroquímicas con detección UV-Visible (Delgado-Zamarreño et al., 2007).

La AOAC ha establecido un método para la determinación de estos compuestos en aceite vegetal comestible, donde la preparación de la muestra incluye una extracción líquido-líquido. En esta se utilizan 5.5 g del aceite vegetal comestible, el cual es añadido en un embudo de separación de 125 mL que contiene 20 mL de hexano saturado con acetonitrilo. Posteriormente, se agita para mezclar la porción de la muestra junto con el hexano y se procede a extraer los antioxidantes fenólicos sintéticos con tres porciones de 50 mL de acetonitrilo saturado con hexano. Una vez realizado lo anterior, se recuperan los extractos en un matraz bola de fondo plano de 250 mL para a continuación evaporar hasta tener de 3 a 4 mL de disolvente, usando para ello un rotavapor con un baño de

agua a  $\leq 40^{\circ}$  C, durante 10 min. Luego se transfiere el disolvente a una probeta graduada con tapón de vidrio de 10 mL y se enjuaga el matraz con pequeñas porciones de acetonitrilo no saturado hasta que se recojan 5 mL, posteriormente se continúa enjuagando el matraz con pequeñas porciones de 2-propanol hasta que se recojan 10 mL. Esta última mezcla es la que se utiliza para su posterior análisis mediante CLAR con detección UV-Vis (AOAC, 1995).

Esta técnica presenta desventajas, tales como el uso de una gran cantidad de muestra y de disolventes tóxicos que se necesitan para llevar a cabo el análisis y, además, es un procedimiento de múltiples pasos, lo cual lo hace ser laborioso y con una gran inversión de tiempo.

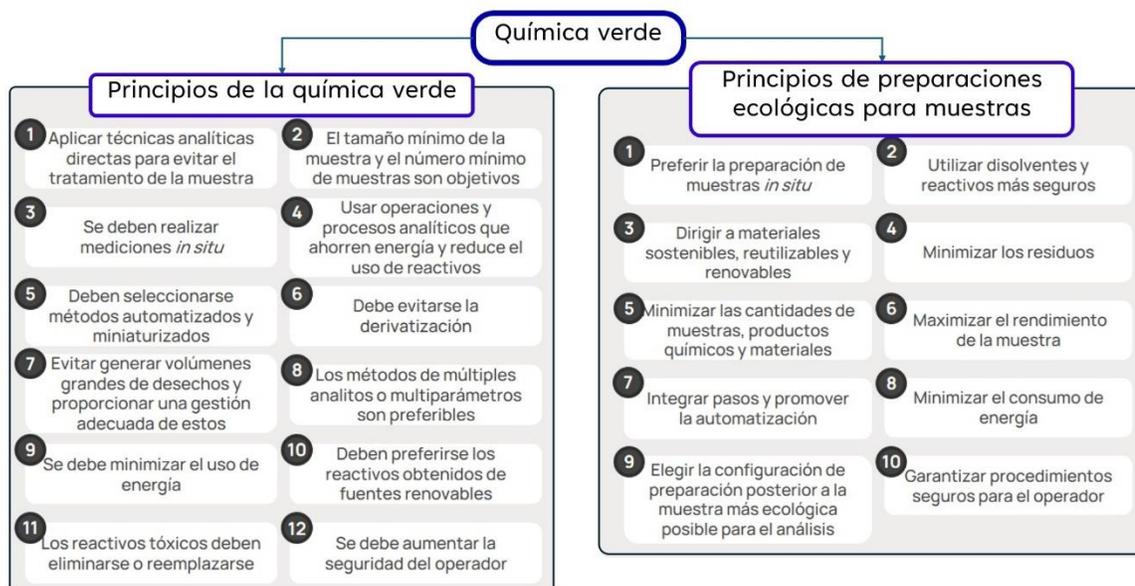
### **1.3 Química verde**

Como consecuencia de las desventajas que se presentan en diversas técnicas analíticas y el impacto que las técnicas de análisis y separación pueden provocar al medio ambiente y la salud, surgió, a principios de la década de 1990, la Química Verde (Gałuszka et al., 2012; Lenoir et al., 2020). La química verde se define como el uso de metodologías o procedimientos químicos en donde se

reducen y/o eliminan el empleo o generación de sustancias peligrosas para el medio ambiente y la salud humana (Anastas, 1999; Armenta et al., 2008).

Posteriormente los conceptos generales relacionados con la Química Verde se han implementado en la Química Analítica, lo que generó el surgimiento del concepto de Química Analítica Verde (GAC, por sus siglas en inglés, Green Analytical Chemistry), lo cual culminó en el desarrollo de 12 principios (Figura 4) (Kokosa & Przyjazny, 2022). Estos principios son conceptos generales, pero precisos, que se han utilizado para desarrollar métodos cuyo propósito es realizar una evaluación ecológica a los métodos analíticos en el proceso de muestreo, preparación, y análisis (Nowak et al., 2021).

Con el fin de enfocar la Química Verde en la preparación ecológica de muestras, se desarrollaron 10 principios ecológicos para este proceso (GSP, por sus siglas en inglés Green Sample Preparation). Estos se basaron en los principios de la GAC, combinando algunos de estos y agregando uno que se ocupa del rendimiento de la muestra, cómo puede verse e la Figura 4 (Kokosa & Przyjazny, 2022).



**Figura 4.** Comparación de los 12 principios de GAC y los 10 principios de GSP (Adaptado de Kokosa & Przyjazny, 2022).

En base a lo anterior, se han establecido cuatro prioridades principales de la Química Verde: 1) eliminar, o reducir la cantidad de reactivos utilizados, particularmente los disolventes orgánicos; 2) disminuir la emisión de vapores y gases, así como de residuos generados en los procedimientos analíticos; 3) excluir reactivos con alta toxicidad y/o ecotoxicidad de los procedimientos realizados; y 4) limitar la mano de obra y energía de los procedimientos analíticos (Namieśnik, 2001).

## 1.4 Técnicas de preparación de muestra.

La preparación de la muestra es una etapa fundamental para la identificación, confirmación y cuantificación inequívoca de los analitos, ya que se pueden ver afectados casi todos los pasos de análisis posteriores, entre ellos la separación y la detección de los analitos, cuando no se realiza o se realiza de manera incorrecta (Chen et al., 2008).

El objetivo principal del tratamiento de muestra es llegar a una muestra libre de interferencias y con la concentración adecuada para el análisis del o los analitos (Pawliszyn, 2012).

Establecer un método de preparación de muestra eficiente puede llegar a ser complicado debido a diversos factores como la presencia de interferencias, la complejidad de las matrices, la baja concentración de analitos y la incompatibilidad de las muestras con el análisis posterior. Por ello, comúnmente se emplean múltiples pasos en esta etapa, lo cual a su vez provoca que sea tediosa, lenta, propensa a la contaminación y a pérdidas tanto de los componentes de la muestra como del analito (Pawliszyn, 2012).

Debido a lo anterior, las técnicas de preparación de muestras se han convertido en un área de oportunidad en la Química Analítica, que ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas y al mejoramiento de las técnicas existentes con

el fin de desarrollar métodos más rápidos, menos costosos y alineados con los principios de la química verde (Kokosa & Przyjazny, 2022).

### **1.5. Técnicas de Microextracción**

Uno de los procesos que se alinean con los principios de la Química Verde, es la miniaturización de las técnicas de extracción convencionales (Armenta et al., 2008).

La microextracción se define como una técnica de extracción donde la cantidad de la fase extractante o de extracción es muy pequeña en relación con la muestra (Lord & Pawliszyn, 2000).

Las técnicas de microextracción presentan destacables ventajas, tales como la facilidad de operación, facilidad de automatización, son relativamente de bajo costo, emplean pocos volúmenes de disolventes, generan baja cantidad de residuos y se adaptan fácilmente a una amplia variedad de muestras y analitos (Valcárcel Cases et al., 2017).

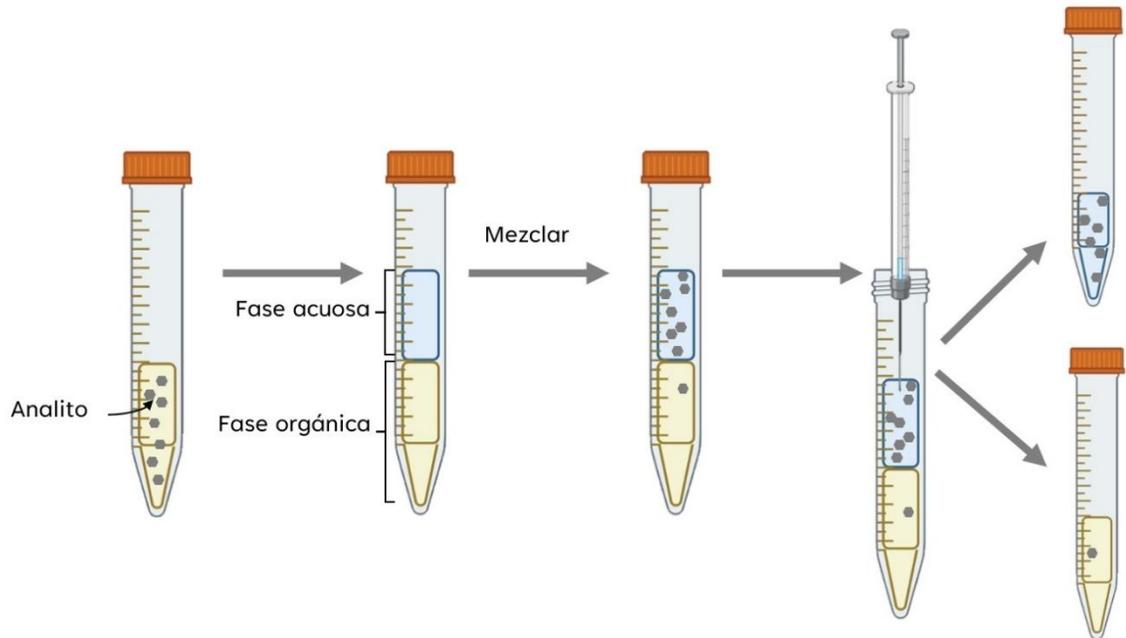
Estas técnicas se dividen en dos categorías en base al estado físico de la fase extractante, la primera es la microextracción en fase líquida y la segunda en

fase sólida. Algunos ejemplos de las técnicas de microextracción líquido-líquido son: la microextracción de gota única (SDME) (Bitas & Samanidou, 2019), la microextracción líquido-líquido (LLME) (Campone et al., 2014), la microextracción líquido-líquido dispersiva (Assadi et al., 2012), entre otras. En cuanto a las que se basan en una fase sólida, se encuentran: la microextracción en fase sólida (SPME) y la microextracción con sorbente empacado (MEPS) (Spiegel et al., 2013), entre otras.

#### 1.5.1 Microextracción líquido-líquido

La microextracción líquido-líquido (LLME) es un método de extracción que se basa, al igual que la extracción líquido-líquido convencional, en la partición de una o más analitos entre disolventes inmiscibles (Yamini et al., 2019).

Esta es una técnica simple y rápida de utilizar, y se ha convertido en un método de extracción verde debido al procedimiento de preparación de muestra minimizado, ya que utiliza cantidades pequeñas de disolvente (fase extractante), en el rango de mililitros o microlitros, (Miskam et al., 2020). El proceso general para llevar a cabo esta técnica se encuentra en la Figura 5.

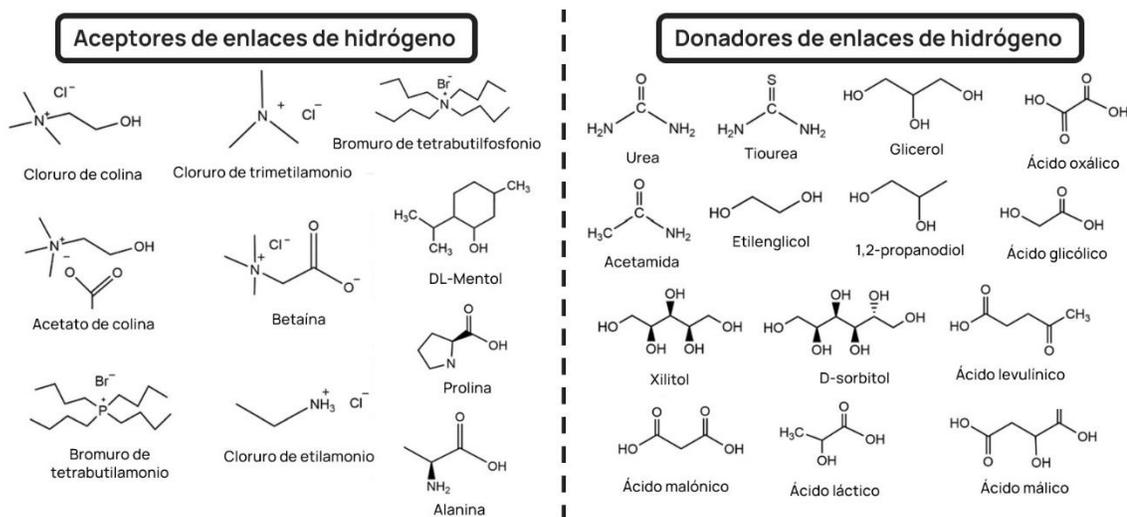


**Figura 5.** Proceso general de la microextracción líquido-líquido.

### 1.6 Disolventes eutécticos profundos.

A pesar de las numerosas ventajas de la LLME los disolventes que se utilizan comúnmente son tóxicos, con alta volatilidad e inflamabilidad. Con la introducción de la Química Verde se han buscado alternativas para estos disolventes, una de ellas son los disolventes eutécticos profundos (DES, por sus siglas en inglés Deep Eutectic Solvent) (Prabhune & Dey, 2023).

Los DES se obtienen al combinar dos o más compuestos sólidos o líquidos, a una cierta proporción molar y temperatura específica, obteniendo como producto una mezcla eutéctica, es decir, una mezcla que tiene un punto de fusión mucho más bajo que el de los componentes originales de forma individual, ocurre una disminución del punto de fusión (Hansen et al., 2021). La disminución del punto de fusión se debe a que en estos compuestos se encuentra una carga deslocalizada que se produce a través de los enlaces de hidrógeno que se forman entre ellos (Zahn et al., 2016). En la Figura 6 se presentan ejemplos de donadores de enlaces de hidrógeno (HBD, por sus siglas en inglés, hydrogen bond donor) y aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA, por sus siglas en inglés, hydrogen bond acceptor) comúnmente utilizados en la síntesis de los DES (El Achkar et al., 2021).



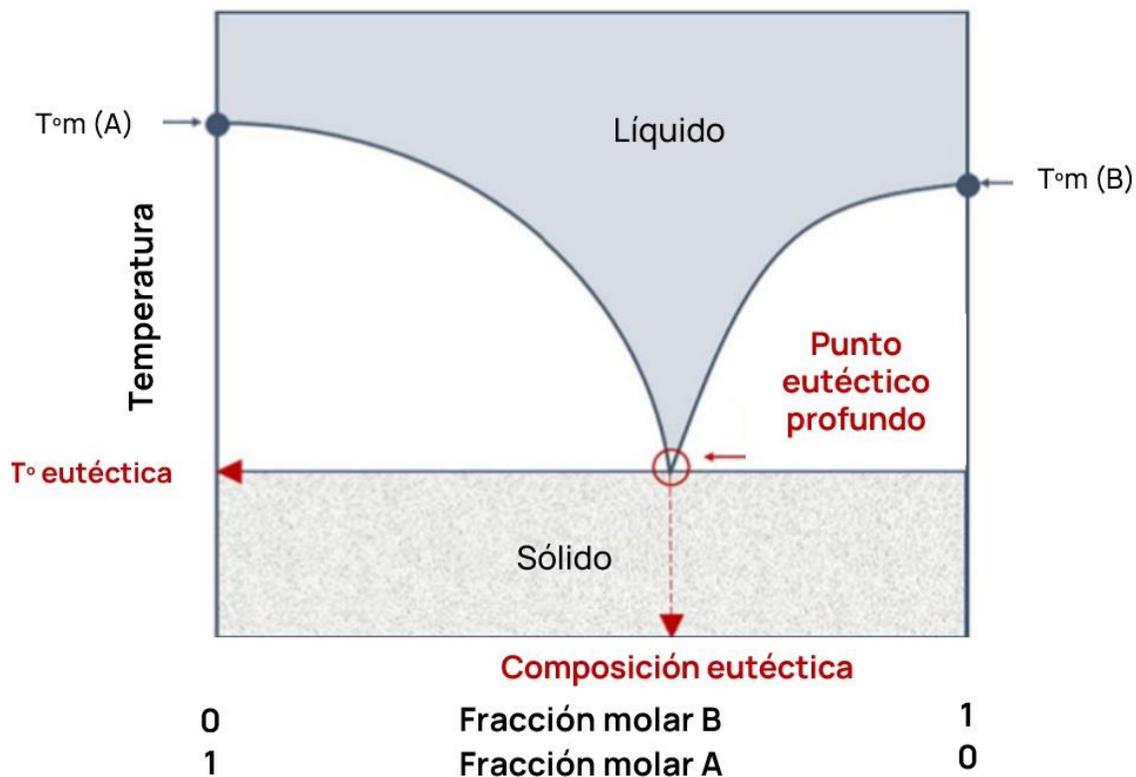
**Figura 6.** Estructura química de algunos aceptores de enlaces de hidrógeno y donantes de enlaces de hidrógeno utilizados para la preparación de disolventes eutécticos profundos.

Existen diferentes tipos de disolventes eutécticos profundos, sin embargo, la fórmula general de estas mezclas es la siguiente:



donde  $Cat^+$  es en principio cualquier catión de amonio, fosfonio o sulfonio, y  $X^-$  es una base de Lewis, generalmente un anión haluro. En este caso se generan especies aniónicas complejas entre  $X^-$  y un ácido Y de Lewis o Brønsted ( $z$  representa al número de moléculas de Y que interactúan con el anión) (Smith et al., 2014). En el caso en el que un HBA sea un compuesto aniónico, como cloruro de colina (ChCl) o betaína, se le considera un DES iónico (Huang et al., 2019).

En un sistema eutéctico la temperatura y la relación molar de los componentes son dos determinantes principales. En la Figura 7, se observa la representación de un diagrama de fase de los componentes de un DES, los cuales interaccionan a través de fuerzas intermoleculares y donde el punto más bajo de las curvas representa el punto de fusión de la mezcla eutéctica a una proporción molar específica (El Achkar et al., 2021).



**Figura 7.** Diagrama general de fases sólido-líquido de una mezcla eutéctica.

Los DES se clasifican en cuatro grupos principales: 1) sal cuaternaria con un cloruro metálico; 2) sal cuaternaria con un cloruro metálico hidratado; 3) sal cuaternaria (HBA) con un compuesto HBD; y 4) cloruro metálico con un HBD. Los dos primeros grupos se utilizan para sintetizar DES con carácter hidrofílico, por el contrario, los otros dos son para DES con carácter hidrofóbico (Plastiras et al., 2020).

Este tipo de nuevos disolventes han tenido un amplio interés dentro de la Química, debido principalmente a sus propiedades fisicoquímicas, ya que,

además de tener buena estabilidad química y térmica, baja inflamabilidad, viscosidad variable y que la mayoría son líquidos a temperatura ambiente. Los DES son considerados químicamente ajustables, es decir, que pueden diseñarse para aplicaciones específicas debido a la gran variedad de compuestos formadores de estos disolventes, por lo que pueden tener tanto un carácter hidrofílico como hidrofóbico (El Achkar et al., 2021). Estas propiedades se ven influenciadas por el tipo de interacción que se produce entre un HBD y un HBA, como intercambio aniónico, interacciones no covalentes débiles y/o enlaces de hidrógeno, las cuales dependen de la combinación entre los componentes que forman el sistema eutéctico y las proporciones molares de estos (Plastiras et al., 2020).

Los DES presentan la ventaja de que son relativamente de bajo costo, debido a que se pueden preparar fácilmente en el laboratorio mediante métodos simples de calentamiento, liofilización y molienda (Huang et al., 2019). En general, la síntesis de los DES se realiza simplemente mezclando los componentes individuales, lo cual mantiene un costo de producción relativamente bajo y permite aplicaciones a gran escala, puesto que los componentes son relativamente económicos (Smith et al., 2014).

Otra ventaja destacable es que, en general, los DES tienen presiones de vapor más bajas que la mayoría de los disolventes convencionales, lo cual genera bajas emisiones a la atmósfera. Además, tienen baja toxicidad, tienen una alta

biocompatibilidad y se consideran como sustancias biodegradables. Por todo lo anterior, se han considerado como disolventes verdes (Huang et al., 2019).

Actualmente se han descrito muchas aplicaciones de estos disolventes dentro de la Química Analítica (Hansen et al., 2021). Por ejemplo, se ha demostrado su uso en la etapa de preparación de muestras, ya que se han realizado extracciones y separaciones utilizándolos como fases extractantes (Dheyab et al., 2021), así como para modificar algunos materiales empleado como fases extractantes, como polímeros o sílice, para mejorar la eficiencia de la extracción (Roda et al., 2019). Actualmente, se ha observado su uso eficiente junto con distintas técnicas de microextracción tanto en fase líquida como en fase sólida (Nakhle et al., 2021; Plastiras et al., 2020; Werner et al., 2022).

## **1.7 Antecedentes**

Anteriormente se ha reportado el uso de los DES para analizar distintos compuestos en aceites vegetales comestibles mediante diversas técnicas de microextracción. En el 2017, W. Liu y colaboradores reportaron que con un volumen del DES de 400  $\mu\text{L}$ , 0.15 g de la muestra y con un tiempo de tiempo de extracción de 30 min, se logró extraer TBHQ en 13 muestras de aceites comestibles utilizando una LLME asistida por ultrasonido con un análisis

mediante CLAR con detector UV-Vis de longitud de onda variable. Esta extracción utilizó un DES compuesto por Etilenglicol y ChCl, con una proporción molar de 1:2, obteniendo recuperaciones de 98.5 a 112%. (W. Liu et al., 2017).

En 2022, Cao y colaboradores utilizaron un DES a base de agua para una LLME asistida por ultrasonido para la extracción de parabenos en aceite vegetal comestible. El DES estuvo constituido por cloruro de tetrabutilamonio como aceptor de enlaces de hidrógeno y agua como donante de enlaces de hidrógeno en una relación molar de 1:5. Se aplicó satisfactoriamente el uso de este DES, puesto que, al utilizar el agua como un componente, se generaron cambios en las propiedades fisicoquímicas del mismo DES, lo que contribuyó a que el cloruro de tetrabutilamonio pudiera capturar más eficazmente a los parabenos, obteniendo recuperaciones del 85.1 a 106.8 % (Cao et al., 2022).

Además, diversos estudios reportan que la adición de agua en el DES puede generar cambios en las propiedades fisicoquímicas como la polaridad, conductividad, punto de fusión, densidad, tensión superficial y viscosidad (El Achkar et al., 2021). Estos cambios son la causa de ciertas ventajas. Por un lado, los cambios en la viscosidad favorecen el manejo de dicho disolvente debido a la disminución de esta y por otro, al adicionar agua el DES se vuelve más ecológico (Gabriele et al., 2019). Así mismo, se ha reportado que la adición de agua en ciertas proporciones puede fortalecer los enlaces de hidrógeno entre los componentes del DES (Hammond et al., 2017).

## **CAPÍTULO 2**

### **JUSTIFICACIÓN**

La microextracción líquido-líquido junto con los disolventes eutécticos profundos (DES) ha demostrado ser una técnica eficiente para la extracción de antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites comestibles. Sin embargo, los trabajos publicados hasta el día de hoy solo incluyen la determinación de un solo antioxidante y los DES utilizados no incluyen el uso de agua. Por lo anterior, resulta interesante proponer el uso de DES alternativos e incluir la determinación de varios antioxidantes que pudieran estar presentes en el aceite vegetal comestible.

## **CAPÍTULO 3**

### **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un método de microextracción líquido-líquido basado en DES para antioxidantes fenólicos sintéticos en aceite vegetal comestible.

## **CAPÍTULO 4**

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Preparar y caracterizar DES a base de cloruro de colina, glicerol y urea.
2. Implementar y validar un método por HPLC para el análisis simultáneo de TBHQ, BHT y BHA.
3. Establecer las condiciones óptimas para la técnica de microextracción líquido-líquido basada en DES para TBHQ, BHT y BHA en aceite vegetal comestible.
4. Evaluar el desempeño del método de extracción previamente optimizado en muestras de aceite vegetal comestible.

## **CAPÍTULO 5**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **5.1. Reactivos.**

Ácido acético ( $\geq 99.7\%$ ), J.T. Baker.

Ácido fórmico ( $\geq 99.7\%$ ), Sigma Aldrich.

Butirilhidroxianisol ( $\geq 98.5\%$ ), Sigma Aldrich.

Butirilhidroxitolueno ( $\geq 99\%$ ), Sigma Aldrich.

Cloruro de colina ( $\geq 99\%$ ), Sigma Aldrich.

Etanol grado CLAR, J.T. Baker

Glicerol ( $\geq 99\%$ ), Sigma Aldrich.

Metanol, grado CLAR, J. T. Baker.

Terbutilhidroquinona (97%), Sigma Aldrich.

Urea ( $\geq 99\%$ ), Sigma Aldrich.

## 5.2. Equipos.

Balanza analítica, OHAUS 3510.

Baño de ultrasonido, Branson 3510.

Bomba de vacío, GAST, modelo: 1 HA B-25-M1100X.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Agilent HP-1100, equipado con sistema de bombeo cuaternario, automuestreador, sistema de control de temperatura para columna y detector UV-Vis de longitud de onda variable.

Espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR-ATR, Modelo Frontier de Perkin Elmer

Placa de calentamiento

Purificador de agua, Pure Lab UHQ, Elga, Veolia.

Recirculador de agua, Modelo DC10-B3 de HAAKE.

Vortex-Genie2 Scientific Industries.

### 5.3. Materiales.

Agitador magnético.

Bulbo para pipeta Pasteur.

Columna Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ , 100 $\text{Å}$ ).

Desecador.

Espátulas.

Frascos reservorios para la fase móvil de 500 mL con tapa rosca.

Matraces volumétricos de 5, 10 y 50 mL.

Matraz bola de fondo plano de 50 mL.

Membranas para filtración para disolventes de Nylon 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore.

Microjeringas de 100, 250 y 500  $\mu\text{L}$ , Hamilton.

Pipetas automáticas de 2 a 20  $\mu\text{L}$ , de 10 a 100  $\mu\text{L}$  y de 100 a 1000  $\mu\text{L}$ , Eppendorf

Papel Parafilm M.

Pipetas Pasteur.

Programa Excel 2007, Microsoft<sup>®</sup>, EE. UU.

Programa MODDE 13, Sartorius, AG. Alemania.

Puntillas para pipeta automática.

Sistema de filtración, Pall Corporation.

Termómetro -20°C a 110°C, Brannan.

Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, Marca HBH, Modelo 80-1500

Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 250 mL.

Viales de vidrio ámbar de 2 mL con tapón de rosca y septum de teflón/silicón,

Agilent Technologies

Viales de vidrio ámbar de 8 y 10 mL.

.

## 5.4. Métodos.

### 5.4.1. Preparación y caracterización de los DES.

Para este proyecto de investigación se utilizaron dos tipos de DES como fases extractantes. Para la síntesis de los DES se utilizó un compuesto como HBA, el cloruro de colina; mientras que como HBD se utilizaron dos compuestos, para un DES el glicerol y para el otro DES a la urea.

Las condiciones que se tomaron en cuenta para la preparación de los DES fueron en base a procedimientos reportados por diversos autores (Peng et al., 2016; Yin et al., 2020). Para el DES formado por cloruro de colina y glicerol (ChCl:Gly), se pesó en una balanza analítica 1.7808 g de cloruro de colina y 2.3134 g de glicerol para tener una proporción molar 1:2. Para el DES formado por cloruro de colina y urea (ChCl:Ur), se pesó 1.7816 g de cloruro de colina y 1.5000 g de urea para tener una proporción molar 1:2. Posteriormente los compuestos de cada DES se colocaron en un matraz bola de fondo plano, se mezclaron y se mantuvieron en agitación constante a 600 rpm a una temperatura de 80 °C en un baño de agua con recirculador durante una hora. Pasado este tiempo se obtuvo un líquido transparente viscoso, lo cual indica la formación del

DES. Finalmente, los DES se colocaron en un desecador al vacío para su almacenamiento hasta su uso.

Para caracterizar los dos DES sintetizados, se dilucidaron las interacciones entre los componentes de los DES utilizando espectroscopia infrarroja. Se obtuvieron espectros FT-IR-ATR para la mezcla eutéctica formada y para los componentes individuales utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR-ATR, Modelo Frontier de Perkin Elmer. Antes de cada análisis el diamante del ATR se limpió con agua y metanol utilizando gasas, después se realizó el registro de la señal de fondo del aire. Previamente, cada compuesto individual y cada DES, fueron llevados a sequedad en una estufa a 60 °C durante 24 h. Después, se colocó una pequeña cantidad de cada compuesto y de los DES en el portamuestras y los espectros se obtuvieron en un intervalo de número de onda de 550 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  con 50 escaneos.

#### 5.4.2. Desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.

Con el fin de desarrollar el método cromatográfico adecuado para la separación de los analitos modelo se utilizó un cromatógrafo HP 1100 y se probó una columna Kinetex C18, (150 x 3 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ , 100 $\text{\AA}$ ). Se utilizó una fase móvil (FM) compuesta por etanol y una solución acuosa de ácido fórmico o ácido acético ambos al 0.1 %. En todos los experimentos llevados a cabo, se mantuvo un flujo de constante de 0.1 mL/min, se probaron diferentes gradientes de la fase móvil y se realizaron variaciones en la temperatura de columna. El volumen de inyección fue de 2  $\mu\text{L}$  y para todos los compuestos la detección se realizó a una longitud de onda de 280 nm.

En todos los experimentos se emplearon estándares en fase móvil de 10 y 100 mg/L del TBHQ, BHA y el BHT. Para la preparación de la solución acuosa de ácido se utilizó agua desionizada obtenida del equipo Pure Lab UHQ, Elga. Posteriormente se filtraron las fases con membranas Nylon (47 mm, 0.45  $\mu\text{m}$  de poro; Durapore, Millipore) y fueron sonicadas por 15 min para su desgasificación.

La selección de las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis de los analitos diana de este trabajo, se llevó a cabo por medio de una inspección visual de los cromatogramas obtenidos, se consideraron los tiempos de retención ( $t_R$ ) de cada analito y la resolución ( $R_s$ ) entre las señales cromatográficas.

#### 5.4.3. Validación del sistema cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.

Para la validación del sistema cromatográfico los parámetros que se evaluaron fueron la linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y cuantificación. Esto se realizó en base a las recomendaciones establecidas por la Eurachem (2014), a excepción de los límites de detección y de cuantificación, donde se tomó en cuenta lo establecido por la ICH (2005). Para llevar a cabo esto, se prepararon soluciones madre individuales de TBHQ, BHT y BHA a una concentración de 500 mg/L en etanol. A partir de estas soluciones se prepararon las soluciones de trabajo para los tres analitos en mezcla disueltos en fase móvil.

- Linealidad

Se construyó una curva de calibración por estándar externo a 7 niveles de concentración (15, 30, 60, 90, 180, 240 y 300 mg/L) en una solución de etanol y ácido acético al 0.1% en una proporción de 45:65, por triplicado. Utilizando las áreas de las señales obtenidas en los cromatogramas se construyó un gráfico de concentración contra las respuestas (áreas).

Para la evaluación de este parámetro se realizó una inspección visual de la curva de calibración obtenida y posteriormente se realizó un análisis de regresión

lineal por el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta y observar la relación de linealidad mediante el coeficiente de determinación ( $R^2 \geq 0.99$ ) y correlación ( $R \geq 0.995$ ) (Castro et al., 2020). Además, se calcularon los factores de respuesta obtenidos en cada nivel de concentración de la curva de calibración (<15%) (Portillo et al., 2022).

- Precisión

Se evaluó mediante el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de las respuestas, para cada nivel de concentración de los estándares de la curva de calibración, de acuerdo con la Ecuación 2. También se evaluó con el porcentaje de desviación estándar relativa de los tiempos de retención ( $t_R$ ) de cada analito.

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}}$$

Ecuación 2.

Donde:

$\%DER$  = Desviación estándar relativa en porcentaje

$s$  = Desviación estándar

$\bar{x}$  = Media

- Exactitud

La exactitud se evaluó mediante la correlación entre la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real. Para ello se calculó la concentración de los estándares utilizando la ecuación obtenida por la curva de calibración y se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados. Se analizaron los valores de la pendiente y el coeficiente de determinación de las curvas de regresión ajustada, considerando como criterios de aceptación valores de  $m \approx 1$  y  $R^2 \geq 0.99$  (Burke, 2001; Swartz & Ira Krull, 2015).

- Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron en base a la relación señal/ruido de los cromatogramas obtenidos de los estándares del nivel más bajo de concentración de la curva de calibración de acuerdo con las Ecuaciones 3 y 4, respectivamente (ICH, 2005).

$$LD = 3 (S/N)$$

Ecuación 3.

Donde:

$LD$  = Límite de detección

$(S/N)$ = Relación señal ruido

$$LC = 10 (S/N)$$

Ecuación 4.

Donde:

$LC$  = Límite de cuantificación

$(S/N)$ = Relación señal ruido

#### 5.4.3.1. Evaluación del efecto de la presencia de los DES en la separación y cuantificación de los analitos

Para determinar el efecto en la separación y en las respuestas cromatográficas obtenidas de los analitos con la presencia de los DES utilizados como fases extractantes, se realizaron inyecciones por triplicado de soluciones estándar de los analitos diana de 100 mg/L, bajo las condiciones del método previamente validado. Las soluciones fueron preparadas bajo las siguientes condiciones: soluciones estándar de los analitos disueltas en fase móvil (FM) compuesta por etanol y una solución acuosa de ácido acético 0.1% (45:55) y disueltas en mezcla de FM y DES en dos proporciones. Las proporciones evaluadas fueron 50:50 (DES:FM, respectivamente) y 70:30 (DES:FM, respectivamente), tanto del DES formado por cloruro de colina con urea y del formado por cloruro de colina con glicerol. Con los resultados obtenidos, se

realizó una prueba estadística  $t$  de Student de dos colas, con un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ) en el programa Excel, para comparar las medias obtenidas de las áreas (respuestas cromatográficas) y los tiempos de retención de los analitos.

5.4.4 Optimización de las condiciones de extracción de TBHQ, BHT y BHA por la técnica de LLME basada en DES en aceite vegetal.

5.4.4.1. Selección de la matriz.

Antes de comenzar con la optimización de la extracción, se realizó una prueba preliminar para seleccionar la matriz libre de los analitos que se utilizó en el proceso de optimización. Para ello se adquirió comercialmente un aceite vegetal comestible que reportó no contener antioxidantes fenólicos sintéticos. Este fue un aceite comestible puro de cártamo de la marca Oléico®. Se realizaron extracciones de esta matriz, sin adición de los analitos, bajo las condiciones que se muestran en la Tabla II, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo con condiciones reportadas en la literatura anteriormente (W. Liu et al., 2017).

**Tabla II.** Condiciones de extracción utilizadas para la selección de la matriz.

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>	
<b><i>Fase extractante (DES)</i></b>	ChCl:Ur, 1:2	ChCl:Gly, 1:2
Volumen de fase extractante	250 $\mu$ L	
Proporción de H <sub>2</sub> O	0	
Cantidad de aceite (muestra)	0.5 g	
Método de agitación	Vórtex	
Tiempo de agitación	5 min	
Velocidad de centrifugación	3000 rpm	
Tiempo de centrifugación	10 min	

Se recuperaron 150  $\mu$ L de cada una de las fases extractantes, se diluyeron con 50  $\mu$ L de la fase móvil (etanol - ácido acético 0.1%, 45:55) y se inyectaron al cromatógrafo bajo las condiciones del método previamente validado.

#### 5.4.4.2. Tamizaje de las condiciones de extracción.

Como un primer paso para la optimización del proceso de microextracción se realizó un diseño de experimentos en el programa MODDE 13 (Sartorius, AG. Alemania) con el fin de realizar un rastreo de las variables o factores de extracción que afectan significativamente la recuperación de los analitos diana y poder obtener la mayor eficiencia en la extracción de dichos compuestos.

Los factores se estudiaron a dos niveles (alto y bajo). Las condiciones se muestran en la Tabla III. Las variables fueron de dos tipos: continuas (numéricas) y determinantes.

**Tabla III.** Variables incluidas en el diseño de experimentos en la etapa de tamizaje.

<b>Variable</b>	<b>Nivel bajo</b>	<b>Nivel alto</b>
Tipo de DES (fase extractante)	ChCl:Gly (1:2)	ChCl:Ur (1:2)
Volumen de fase extractante	100 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Proporción de H <sub>2</sub> O	0%	30%
Cantidad de aceite (muestra)	0.2 g	0.5 g
Método de agitación	Vórtex	Ultrasonido
Tiempo de extracción	1 min	5 min
Velocidad de centrifugación	3000 rpm	5000 rpm
Tiempo de centrifugación	1 min	5 min

Las variables determinantes se evaluaron a dos niveles codificados como 1 y 2, las cuales fueron el tipo de DES, donde el DES que está compuesto por ChCl:Gly (1:2) corresponde al 1 y el de ChCl:Ur (1:2) corresponde a 2; y el método de agitación, donde el vórtex corresponde a 1 y el ultrasonido corresponde a 2.

Todas las variables, tanto continuas como determinantes, se evaluaron bajo un diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{8-2}$  aleatorizado con 3 puntos centrales y sin bloques, el cual constó de un total de 67 experimentos de acuerdo con la matriz proporcionada por el programa MODDE 13 en la Tabla IV.

**Tabla IV.** Diseño de experimentos factorial fraccionado utilizado en la etapa de tamizaje (experimento 1 al 20).

<i>Experimento</i>	<i>Variable</i>							
	<b>Cantidad de muestra (g)</b>	<b>Volumen de fase extractante (µL)</b>	<b>Tipo de DES</b>	<b>Proporción de agua (%)</b>	<b>Método de agitación</b>	<b>Tiempo de agitación (min)</b>	<b>Velocidad de centrifugación (rpm)</b>	<b>Tiempo de centrifugación (min)</b>
1	0.5	100	1	30	1	1	3000	5
2	0.2	100	2	0	1	1	3000	5
3	0.2	500	1	0	1	1	3000	5
4	0.5	500	2	30	1	1	3000	5
5	0.5	100	1	0	2	1	3000	5
5	0.5	100	1	0	2	1	3000	5
6	0.2	100	2	30	2	1	3000	5
7	0.2	500	1	30	2	1	3000	5
8	0.5	500	2	0	2	1	3000	5
9	0.5	100	1	0	1	5	3000	5
10	0.2	100	2	30	1	5	3000	5
11	0.2	500	1	30	1	5	3000	5
12	0.5	500	2	0	1	5	3000	5
13	0.5	100	1	30	2	5	3000	5
14	0.2	100	2	0	2	5	3000	5
15	0.2	500	1	0	2	5	3000	5
16	0.5	500	2	30	2	5	3000	5
17	0.2	100	1	30	1	1	5000	5
18	0.5	100	2	0	1	1	5000	5
19	0.5	500	1	0	1	1	5000	5

**Tabla IV.** Diseño de experimentos factorial fraccionado utilizado en la etapa de tamizaje (experimento 20 al 39).

<i>Experimento</i>	<i>Variable</i>							
	<b>Cantidad de muestra</b>	<b>Volumen de fase extractante</b>	<b>Composición de DES</b>	<b>Proporción de agua</b>	<b>Método de agitación</b>	<b>Tiempo de agitación</b>	<b>Velocidad de centrifugación</b>	<b>Tiempo de centrifugación</b>
20	0.2	500	2	30	1	1	5000	5
21	0.2	100	1	0	2	1	5000	5
22	0.5	100	2	30	2	1	5000	5
23	0.5	500	1	30	2	1	5000	5
24	0.2	500	2	0	2	1	5000	5
25	0.2	100	1	0	1	5	5000	5
26	0.5	100	2	30	1	5	5000	5
27	0.5	500	1	30	1	5	5000	5
28	0.2	500	2	0	1	5	5000	5
29	0.2	100	1	30	2	5	5000	5
30	0.5	100	2	0	2	5	5000	5
31	0.5	500	1	0	2	5	5000	5
32	0.2	500	2	30	2	5	5000	5
33	0.2	100	1	30	1	1	3000	10
34	0.5	100	2	0	1	1	3000	10
35	0.5	500	1	0	1	1	3000	10
36	0.2	500	2	30	1	1	3000	10
37	0.2	100	1	0	2	1	3000	10
38	0.5	100	2	30	2	1	3000	10
39	0.5	500	1	30	2	1	3000	10

**Tabla IV.** Diseño de experimentos factorial fraccionado utilizado en la etapa de tamizaje (experimento 40 al 59).

<i>Experimento</i>	<i>Variable</i>							
	<b>Cantidad de muestra</b>	<b>Volumen de fase extractante</b>	<b>Composición de DES</b>	<b>Proporción de agua</b>	<b>Método de agitación</b>	<b>Tiempo de agitación</b>	<b>Velocidad de centrifugación</b>	<b>Tiempo de centrifugación</b>
40	0.2	500	2	0	2	1	3000	10
41	0.2	100	1	0	1	5	3000	10
42	0.5	100	2	30	1	5	3000	10
43	0.5	500	1	30	1	5	3000	10
44	0.2	500	2	0	1	5	3000	10
45	0.2	100	1	30	2	5	3000	10
46	0.5	100	2	0	2	5	3000	10
47	0.5	500	1	0	2	5	3000	10
48	0.2	500	2	30	2	5	3000	10
49	0.5	100	1	30	1	1	5000	10
50	0.2	100	2	0	1	1	5000	10
51	0.2	500	1	0	1	1	5000	10
52	0.5	500	2	30	1	1	5000	10
53	0.5	100	1	0	2	1	5000	10
54	0.2	100	2	30	2	1	5000	10
55	0.2	500	1	30	2	1	5000	10
56	0.5	500	2	0	2	1	5000	10
57	0.5	100	1	0	1	5	5000	10
58	0.2	100	2	30	1	5	5000	10
59	0.2	500	1	30	1	5	5000	10

**Tabla IV.** Diseño de experimentos factorial fraccionado utilizado en la etapa de tamizaje (experimento 60 al 67).

<i>Experimento</i>	<i>Variable</i>							
	<b>Cantidad de muestra</b>	<b>Volumen de fase extractante</b>	<b>Composición de DES</b>	<b>Proporción de agua</b>	<b>Método de agitación</b>	<b>Tiempo de agitación</b>	<b>Velocidad de centrifugación</b>	<b>Tiempo de centrifugación</b>
60	0.5	500	2	0	1	5	5000	10
61	0.5	100	1	30	2	5	5000	10
62	0.2	100	2	0	2	5	5000	10
63	0.2	500	1	0	2	5	5000	10
64	0.5	500	2	30	2	5	5000	10
65	0.35	300	1.5	15	1.5	3	4000	7.5
66	0.35	300	1.5	15	1.5	3	4000	7.5
67	0.35	300	1.5	15	1.5	3	4000	7.5

El protocolo general de extracción consistió en el pesaje de la cantidad de aceite vegetal libre de antioxidantes fenólicos sintéticos, indicado por la matriz de experimentos, en una balanza analítica utilizando un tubo cónico de 1.5 mL. Luego se añadió cierto volumen de la solución estándar de antioxidantes (TBHQ, BHA y BHT) para tener una concentración final de 100 mg/L de cada uno. Posteriormente, se agregó cierto volumen del DES y proporción de agua, dependiendo del experimento; se agitó por los minutos y método indicados según el experimento desarrollado. Por último, se centrifugó a la velocidad y por el tiempo especificado por cada experimento. Luego, para el análisis cromatográfico se procedió a recuperar 90  $\mu$ L de la fase rica en DES (fase extractante), se colocaron en un vial con inserto y se agregaron 40  $\mu$ L de fase móvil (etanol - ácido acético 0.1%, 45:55). Estos extractos se inyectan al cromatógrafo y posteriormente se obtuvieron los datos de las áreas de los picos cromatográficos de los compuestos de cada uno de los experimentos y se introdujeron en el programa MODDE 13.

Para evaluar el efecto y la significancia de las variables en el proceso de extracción de los analitos, se construyeron los gráficos de coeficiente a partir de las áreas obtenidas de los picos cromatográficos en las diferentes condiciones experimentales, con ayuda del programa MODDE 13.

Del mismo modo, con el mismo programa y los datos obtenidos de los experimentos, se construyeron gráficos de contorno como un modelo de predicción para encontrar el impacto que tienen las variables estudiadas sobre las respuestas de los analitos. Una vez obtenidos los valores de las variables en los cuales se espera una mayor respuesta se procedió a la etapa de optimización de dichas variables.

#### 5.4.4.3. Optimización de las condiciones de extracción.

Una vez que se identificaron las variables con influencia significativa en la recuperación de los analitos diana, se procedió a optimizar estas condiciones, las cuales fueron el volumen de fase extractante, tiempo de agitación y tiempo de centrifugación, tal como se muestra en la Tabla V. Para llevar a cabo la optimización, se utilizó un diseño de experimentos simplex de múltiple descarte con el set de experimentos desglosado en la Tabla VI. Por último, se analizaron los extractos por CLAR con el método previamente validado, posteriormente se introdujeron los datos de las respuestas obtenidas en el programa Excel para ser procesados y obtener los valores óptimos de las variables para la mayor eficiencia de la extracción.

**Tabla V.** Variables incluidas en el diseño de experimentos en la etapa de optimización.

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
<b>DES (fase extractante)</b>	ChCl:Gly (1:2)
<b>Proporción de H<sub>2</sub>O</b>	0 %
<b>Cantidad de aceite (muestra)</b>	0.2 g
<b>Método de agitación</b>	Vórtex
<b>Velocidad de centrifugación</b>	5000 rpm

**Tabla VI.** Diseño de experimentos simplex de múltiple descarte utilizado en la etapa de optimización.

<b>Experimento</b>	<b>Volumen de la fase extractante (µL)</b>	<b>Tiempo de agitación (min)</b>	<b>Tiempo de centrifugación (min)</b>
1	50	4	8
2	100	4	8
3	75	7	8
4	75	5.5	12
5	100	10	8
6	75	8.5	4
7	50	10	8
8	50	7	8

5.4.5. Evaluación del desempeño del método de extracción previamente optimizado y validado en muestras de aceite vegetal.

5.4.5.1. Validación del método de microextracción líquido-líquido.

Durante los experimentos de la optimización de la extracción, se observó que las recuperaciones para los antioxidantes BHA y BHT fueron bajas, de manera que se decidió desarrollar y validar un nuevo método tomando en cuenta solo al TBHQ. Para la evaluación se tomaron en cuenta los parámetros de linealidad, efecto de matriz, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación. El análisis de todos los experimentos se llevó a cabo en el cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 con detector UV-Vis con las condiciones cromatográficas mostradas a continuación (Tabla VII).

**Tabla VII.** Condiciones óptimas para el análisis del TBHQ.

<b>Columna</b>	Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6 $\mu$ m C18, 100Å)		
<b>Fase móvil</b>	Fase A: Ácido acético 0.1%; Fase B: Etanol		
<b>Flujo</b>	0.15 mL/min		
<b>Gradiente</b>	Tiempo (mi)	Fase A	Fase B
	0	40	60
	10	0	100
	20	0	100
	23	40	60
40	40	60	
<b>Temperatura de la columna</b>	45° C		
<b>Volumen de inyección</b>	2 $\mu$ L		
<b>Detección</b>	280 nm		

Para llevar a cabo la evaluación del método propuesto se construyeron dos curvas de calibración a 7 niveles de concentración (1, 5, 15, 25, 75, 150, 300 mg/L), por triplicado. En una de estas curvas, los estándares se prepararon en fase móvil y no fueron sometidos al proceso de extracción. Mientras que, en la otra curva de calibración, los estándares se prepararon en matriz, es decir en el aceite vegetal libre de antioxidantes fenólicos sintéticos seleccionado y los estándares fueron sometidos al proceso de extracción con las condiciones previamente seleccionadas como óptimas.

La evaluación de los parámetros de linealidad, precisión y exactitud de las curvas de calibración se realizó como se menciona en la sección 5.4.2.1.

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron con las siguientes ecuaciones (ICH, 2005).

$$LD = 3.3\sigma/s$$

Ecuación 5.

$LD$  = Límite de detección

$\sigma$  = Desviación estándar de la pendiente

$s$  = Pendiente de la curva de calibración

$$LD = 10\sigma/s$$

Ecuación 6.

$LC$  = Límite de cuantificación

$\sigma$ = Desviación estándar de la pendiente

$s$ = Pendiente de la curva de calibración

Para evaluar el efecto matriz se preparó una curva de calibración de estándares en hexano (matriz oleosa) por triplicado, en el mismo rango de concentración utilizado para las curvas de calibración en fase móvil y matriz de aceite. Los estándares preparados fueron sometidos al proceso de extracción con las condiciones seleccionadas como óptimas. Cabe mencionar que de esta curva de calibración se evaluó la linealidad, precisión y exactitud de acuerdo con lo mencionado en la sección 5.4.2. y los límites de detección y cuantificación se evaluaron con las Ecuaciones 5 y 6.

El efecto matriz se evaluó mediante la relación entre la pendiente de la curva de calibración en hexano y la pendiente de la curva de calibración en matriz de aceite después de llevar a cabo el proceso de extracción en cada una de ellas. Para esta esta evaluación se realizó una prueba  $t$  de Student ( $\alpha=0.05$ ) en el programa Excel (Aguilar-Arteaga et al., 2020), entre las pendientes de las curvas previamente mencionadas. Por otra parte, también se evaluó el efecto de matriz mediante el cálculo del parámetro llamado efecto matriz (EM %), de acuerdo con

lo reportado en la bibliografía (Buppasang et al., 2022; Santaladchaiyakit et al., 2022) y mediante el uso de la Ecuación 7.

$$EM(\%) = \frac{\text{Pendiente de las muestras reales adicionadas}}{\text{Pendiente de las soluciones estandar en hexano}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7.}$$

#### 5.4.5.2. Evaluación del desempeño analítico del método propuesto.

Para la evaluación del desempeño analítico del método desarrollado se evaluó la precisión, exactitud y el factor de enriquecimiento.

Para la precisión y exactitud se analizaron muestras de aceite vegetal comestible (libre de antioxidantes) añadidas a tres niveles de concentración (10, 100 y 200 mg/L) de TBHQ por triplicado.

La precisión se evaluó en términos de precisión intradía e interdía. Para la precisión intradía se analizaron tres replicados de las muestras adicionadas a de cada nivel de concentración bajo las condiciones óptimas de extracción en un mismo día. Mientras que para la precisión interdía se analizaron tres replicados de las muestras adicionadas de cada nivel de concentración bajo las condiciones óptimas de extracción en tres días consecutivos. Para la evaluación de estos parámetros, se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa de las

concentraciones obtenidas de cada muestra adicionada y también se calculó para los tiempos de retención ( $t_R$ ), de acuerdo con la Ecuación 1.

Para la exactitud se obtuvo el porcentaje de recuperación de las muestras adicionadas utilizadas en los experimentos de precisión, los cálculos se realizaron en base a la Ecuación 8 (Aguilar et al., 2020).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{muestra adicionada}}}{C_{\text{esperada}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8.}$$

La eficiencia de extracción se evaluó mediante el factor de enriquecimiento (FE) (Karami & Shokrollahi, 2023) utilizando la Ecuación 9.

$$FE = \frac{\text{Pendiente de la curva de calibración en DES}}{\text{Pendiente de la curva de calibración (inyección directa)}} \quad \text{Ecuación 9.}$$

#### 5.4.5.3. Evaluación ecológica del método propuesto.

Para evaluar el grado ecológico del método propuesto para la determinación de TBHQ en aceite vegetal comestible se utilizaron tres escalas ecológicas, Analytical Eco-Scale, Green Analytical Procedure Index (GAPI) y Analytical GREENness metric (AGREE).

Los datos obtenidos con las escalas utilizadas se compararon con los resultados obtenidos para otros métodos propuestos.

#### 5.4.5.4. Aplicación del método de microextracción propuesto.

El método propuesto se aplicó al análisis de diferentes muestras comerciales de aceite vegetal comestible, las cuales fueron sometidas al protocolo de extracción y posterior análisis por CLAR-UV-Vis bajo las condiciones del método validado. La marca, origen vegetal y el contenido de antioxidantes fenólicos sintéticos reportado de las muestras analizadas se encuentran en la Tabla VIII.

**Tabla VIII.** Información de las muestras analizadas con el método propuesto.

<b>Muestra</b>	<b>Muestra 1</b> 	<b>Muestra 2</b> 	<b>Muestra 3</b> 
<b>Marca</b>	Mazola®	Vita premium®	Kartamus®
<b>Origen vegetal</b>	Maíz	Soya	Mezcla de canola, soya, girasol y cártamo
<b>Contenido de antioxidantes fenólicos sintéticos reportado</b>	TBHQ: 0.01%	TBHQ: 0.01%	TBHQ: <0.02%

## **CAPÍTULO 6**

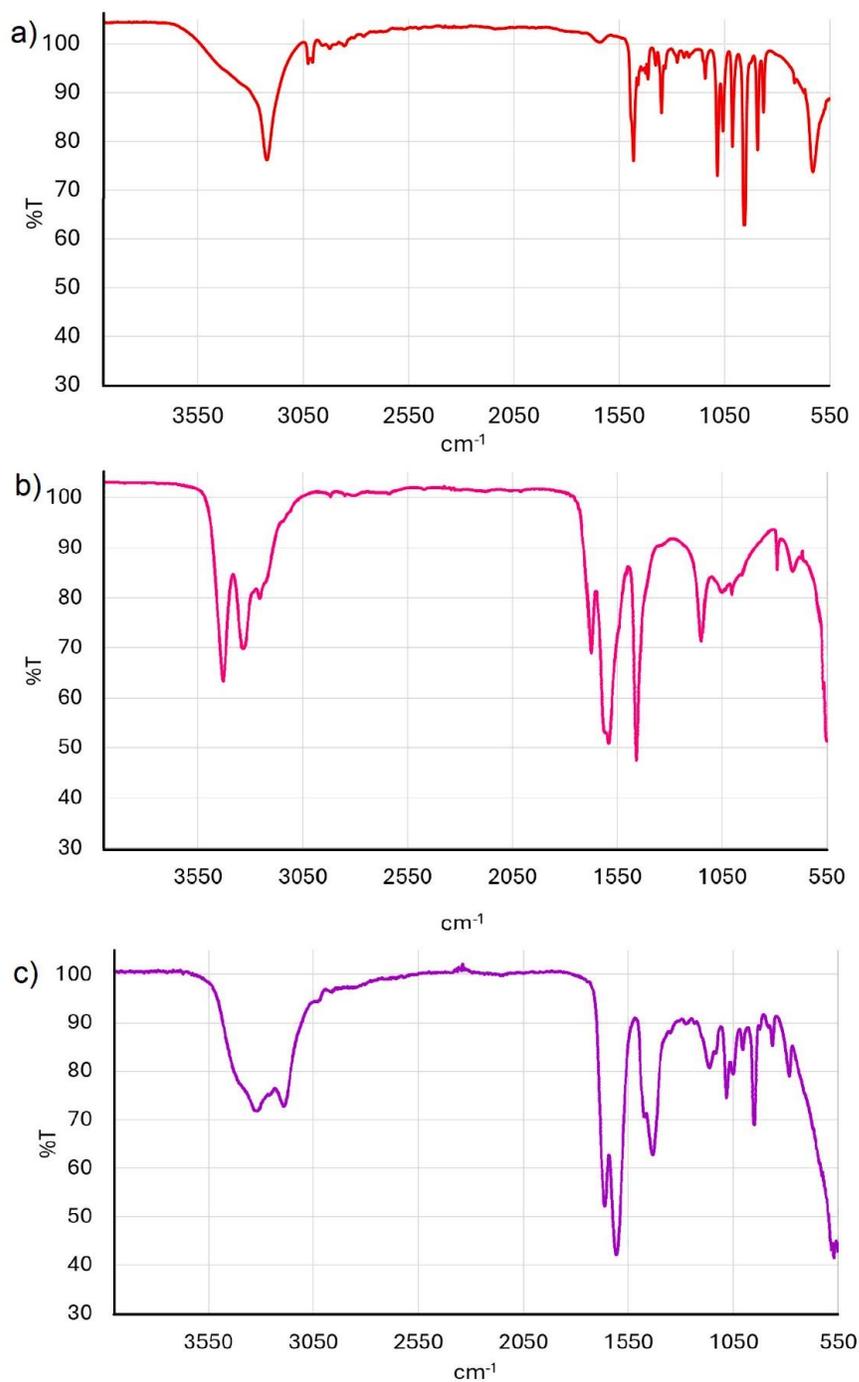
### **RESULTADOS**

#### **6.1. Preparación y caracterización de los DES.**

En este trabajo, se sintetizaron dos DES hidrofílicos, los cuales fueron evaluados como fases extractantes para TBHQ, BHA y BHT. Un DES estuvo conformado por ChCl como HBA y glicerol como HBD en una proporción molar 1:2, respectivamente; mientras que el otro estuvo conformado por ChCl como HBA y urea como HBD también en una proporción molar 1:2. Los dos DES, fueron sintetizados bajo las condiciones evaluadas (80°C y agitación constante a

600 rpm, 1 hora), para ambos se obtuvo un líquido transparente, incoloro y viscoso. En ninguno de los casos se observó formación de cristales.

Para la caracterización, se obtuvieron espectros de infrarrojo del DES de cloruro de colina y urea (1:2), así como de sus componentes individuales (Figura 8) y del DES de cloruro de colina y glicerol (1:2), al igual que los componentes individuales de este (Figura 9).



**Figura 8.** Espectros infrarrojo de: a) cloruro de colina, b) urea, c) DES compuesto de cloruro de colina y urea (1:2).

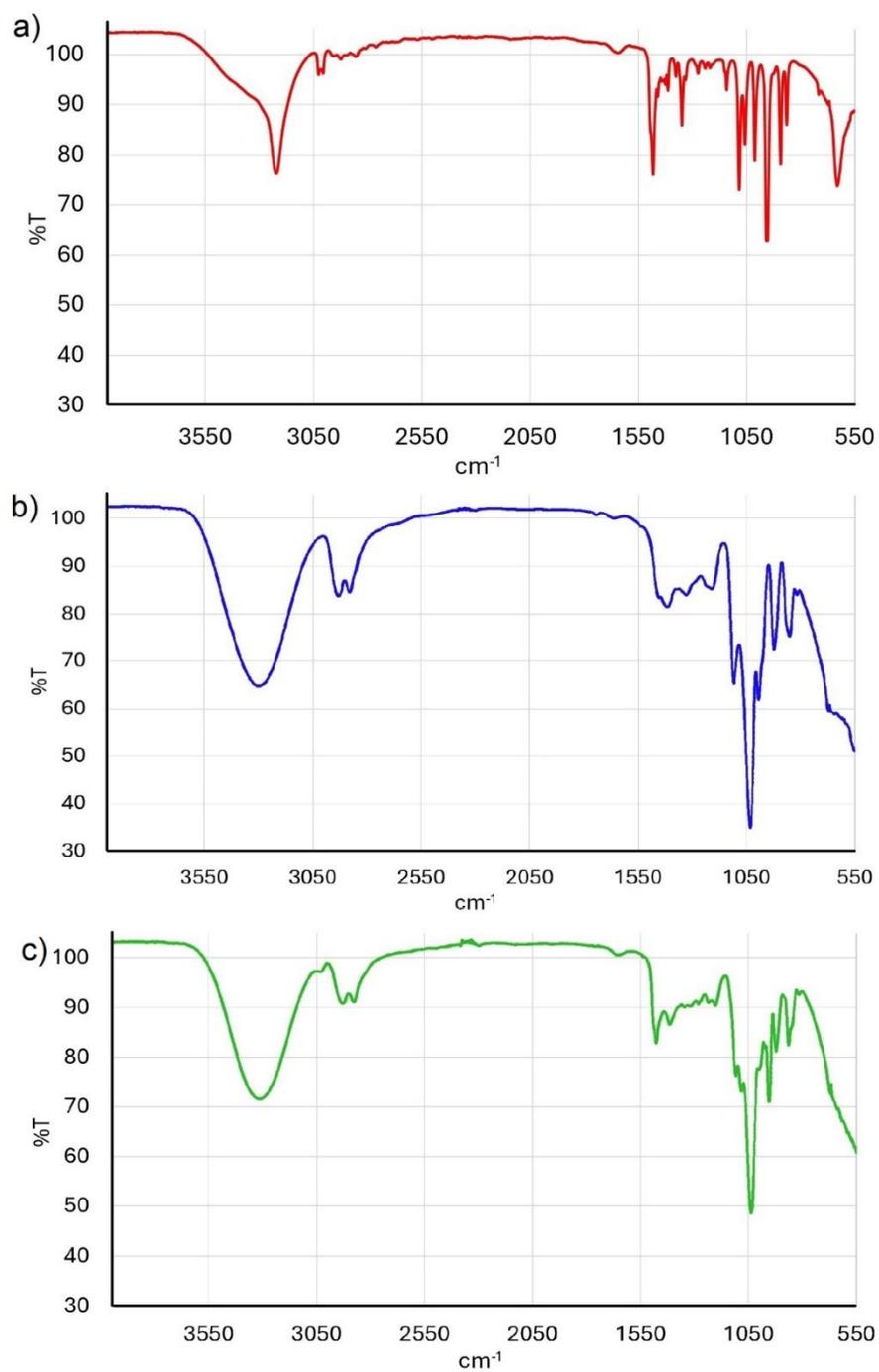


Figura 9. Espectros infrarrojo de: a) cloruro de colina, b) glicerol, c) DES compuesto de cloruro de colina y glicerol (1:2).

Al comparar los espectros obtenidos de los DES con los espectros de los correspondientes compuestos que los conforman, se observó que no hay presencia de nuevas señales, que algunas de las señales se han desplazado debido a las interacciones entre los componentes y que otras se solapan. Esto nos indica que los DES se formaron de manera adecuada.

## **6.2 Desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.**

Con la columna seleccionado, se probaron diversas condiciones cromatográficas, en las que se hicieron cambios en el gradiente de la fase móvil. La fase móvil estuvo compuesta por ácido fórmico 0.1% y etanol, mientras que en otros métodos se utilizó una fase móvil compuesta por ácido acético 0.1% y etanol. En la Tabla IX se presenta un resumen de los resultados obtenidos con las condiciones cromatográficas probadas, y en el apartado de anexos se encuentran las condiciones evaluadas, así como cromatogramas representativos obtenidos bajo las condiciones evaluadas.

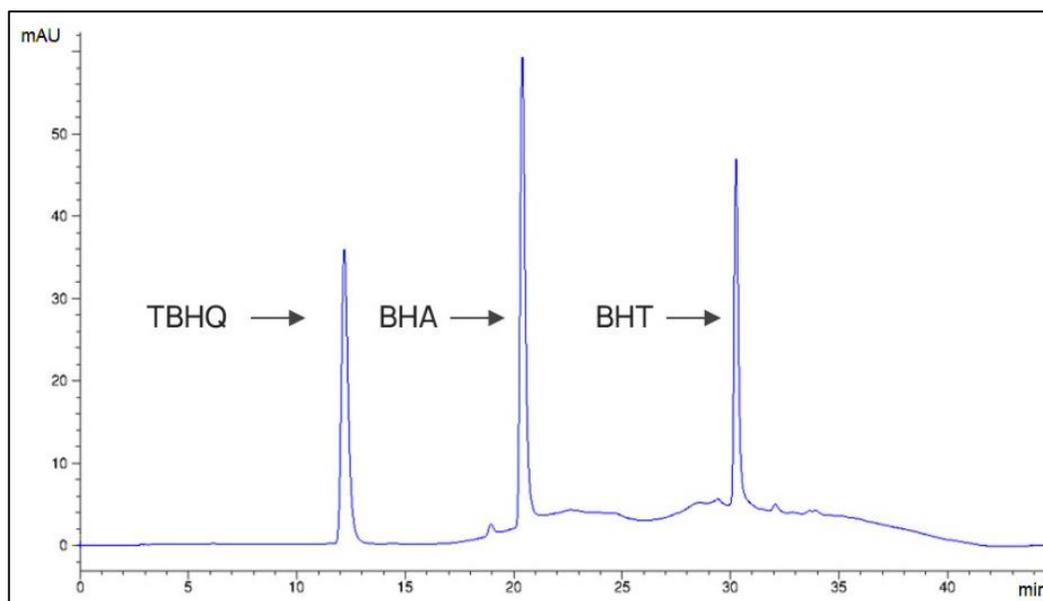
**Tabla IX.** Resumen de los resultados obtenidos en el desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHA y BHT.

Condición cromatográfica evaluada	Resultados
Fase móvil	
Fase A: Ácido fórmico 0.1% Fase B: Etanol	Resolución > 1.5 Deriva en la línea base
Fase A: Ácido acético 0.1% Fase B: Etanol	Resolución > 1.5 Deriva de la línea base

En base a los resultados obtenidos se seleccionó el método en el que se obtuvo una separación adecuada de los tres analitos diana en el menor tiempo de análisis y una menor deriva de la línea base, las condiciones de este método se muestran en la Tabla X. Utilizando dicho método se obtuvo una resolución entre el TBHQ y el BHA de 25.6 y entre el BHA y BHT de 37.3. De igual forma, en la Figura 10 se presenta un cromatograma obtenido utilizando dichas condiciones para un estándar en mezcla de los analitos a una concentración de 60 mg/L preparado en fase móvil.

**Tabla X.** Condiciones óptimas para el análisis del TBHQ, BHA y BHT.

<b>Columna</b>	Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6 $\mu$ m C18, 100Å)		
<b>Fase móvil</b>	Fase A: Ácido acético 0.1%; Fase B: Etanol		
<b>Flujo</b>	0.1 mL/min		
<b>Gradiente</b>	Tiempo (min)	Fase A	Fase B
	0	55	45
	10	0	100
	15	0	100
	18	55	45
50	55	45	
<b>Temperatura de la columna</b>	45° C		
<b>Volumen de inyección</b>	2 $\mu$ L		
<b>Detección</b>	280 nm		



**Figura 10.** Cromatograma de una solución en mezcla de TBHQ, BHA y BHT (60 mg/L en fase móvil compuesta por etanol y una solución acuosa de ácido acético 0.1%, 45:55) bajo las condiciones de la Tabla XIII.

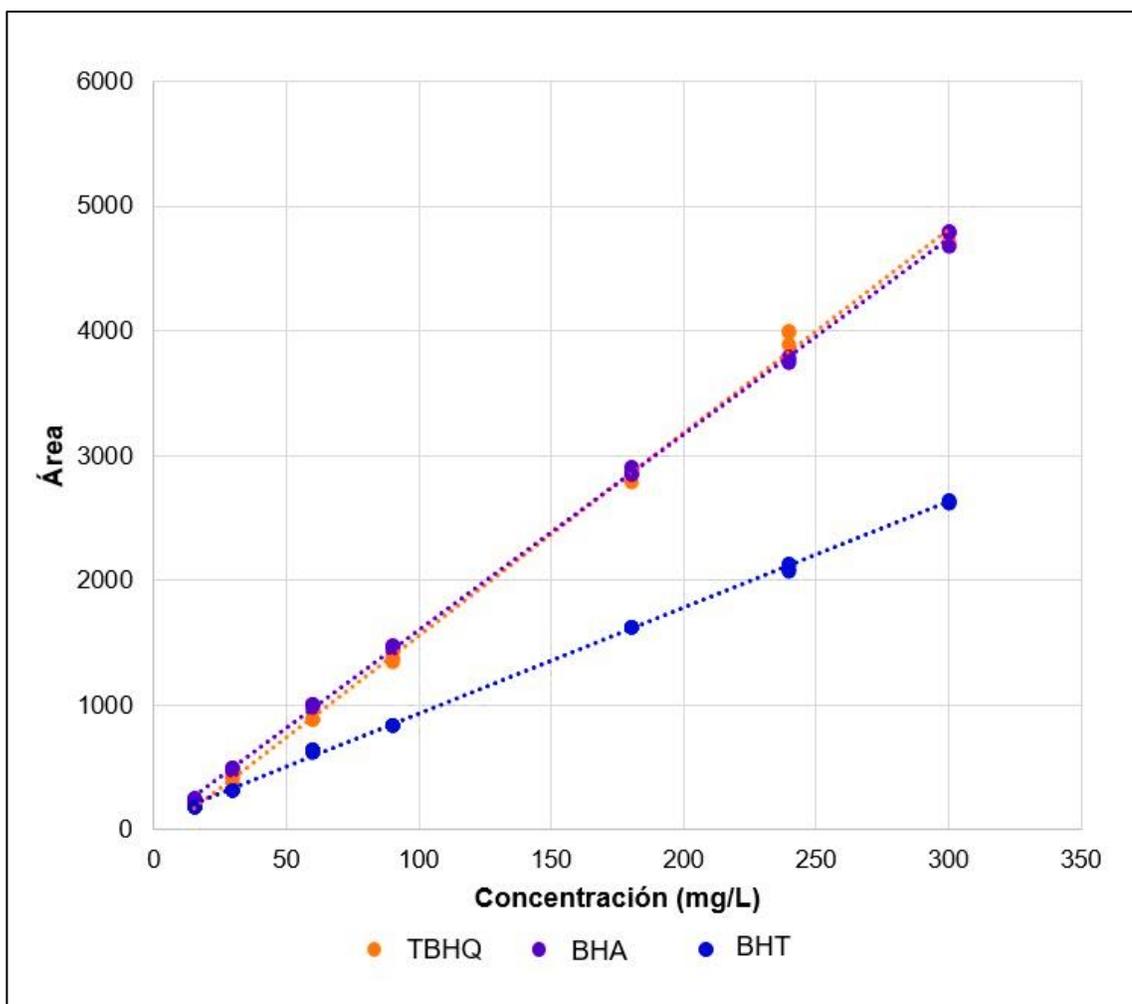
### **6.3. Validación del sistema cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.**

El sistema cromatográfico fue validado incluyendo los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación. Los resultados de la validación se presentan en la Tabla XI. Las curvas de calibración resultantes que se realizaron para el parámetro de linealidad se muestran en la Figura 11.

**Tabla XI.** Resultados de la validación del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de TBHQ, BHA y BHT.

<b>Analito</b>		<b>TBHQ</b>	<b>BHA</b>	<b>BHT</b>
<b>Parámetro</b>				
<b>Rango lineal</b>		15 - 300 mg/L		
<b>Linealidad</b>	Ecuación de regresión	$y = 16.274x - 72.66$	$y = 15.703x + 31.599$	$y = 8.5192x + 77.503$
	R <sup>2</sup>	0.998	0.999	0.999
	R	0.999	0.999	0.999
	%DER de factores de respuesta	7.953	2.480	12.616
<b>Precisión</b>	% DER de respuestas*	0.768 – 2.885	0.547 – 2.037	0.381 – 2.549
	% DER de t <sub>R</sub>	0.204	0.138	0.042
<b>Exactitud</b>	Pendiente	0.9984	1	1
	R <sup>2</sup>	0.9984	0.9996	0.9993
<b>Límite de detección</b>		1.079 mg/L	0.686 mg/L	2.419 mg/L
<b>Límite de cuantificación</b>		3.596 mg/L	2.288 mg/L	8.065 mg/L

\*%DER de las respuestas de cada nivel de concentración.



**Figura 11.** Curvas de calibración de los antioxidantes fenólicos sintéticos TBHQ, BHA y BHT bajo las condiciones del método de la Tabla XIII.

### 6.3.1 Evaluación del efecto de la presencia de los DES en la separación y cuantificación de los analitos

Los resultados correspondientes a la evaluación de la posible interferencia de las fases extractantes (DES sintetizados) sobre la separación y cuantificación de los analitos se presentan en las Tablas XII, XIII y XIV. En ellas se muestran los promedios de las respuestas (áreas) y de los tiempos de retención obtenidos a partir del análisis de los analitos en presencia de los dos DES evaluados como fases extractantes, el compuesto por cloruro de colina y urea (1:2) y el compuesto por cloruro de colina y glicerol (1:2), en las proporciones evaluadas. En estas tablas también se presenta el valor crítico de  $t$  y la  $t$  calculada de las pruebas realizadas.

**Tabla XII.** Análisis del TBHQ en presencia de los DES compuestos por cloruro de colina y urea (1:2) y cloruro de colina y glicerol (1:2).

Disolvente		TBHQ*			
		Área ( $\bar{x}$ )	$t$ crítica	$t_R$ ( $\bar{x}$ )	$t$ crítica
Fase móvil (FM**)		1707.696	4.303	12.126	4.302
DES	Proporción (DES:FM)	Área ( $\bar{x}$ )	$t$ calculada	$t_R$ ( $\bar{x}$ )	$t$ calculada
ChCl:Ur	50:50	1728.854	-1.958	12.151	-0.949
	70:30	1721.107	-1.105	12.178	-2.311
ChCl:Gly	50:50	1686.110	4.009	12.179	-3.422
	70:30	1647.123	4.248	12.171	-1.747

\*Análisis por triplicado.

\*\*FM = etanol y solución acuosa de ácido acético al 0.1% (55:45).

**Tabla XIII.** Análisis del BHA en presencia de los DES compuestos por cloruro de colina y urea (1:2) y cloruro de colina y glicerol (1:2).

Disolvente		BHA*			
		Área ( $\bar{x}$ )	$t$ crítica	$t_R$ ( $\bar{x}$ )	$t$ crítica
Fase móvil (FM**)		1575.914	4.303	20.365	4.303
DES	Proporción (DES:FM)	Área ( $\bar{x}$ )	$t$ calculada	$t_R$ ( $\bar{x}$ )	$t$ calculada
ChCl:Ur	50:50	1648.691	-4.245	20.381	-4.221
	70:30	1743.899	-2.009	20.371	-0.447
ChCl:Gly	50:50	1664.750	-1.533	20.378	-2.360
	70:30	1686.227	-1.065	20.379	-2.425

\*Análisis por triplicado.

\*\*FM = solución compuesta por etanol y solución acuosa de ácido acético al 0.1% (55:45).

**Tabla XIV.** Análisis del BHT en presencia de los DES compuestos por cloruro de colina y urea (1:2) y cloruro de colina y glicerol (1:2).

Disolvente		BHT*			
		Área ( $\bar{x}$ )	$t$ crítica	$t_R$ ( $\bar{x}$ )	$t$ crítica
Fase móvil (FM**)		1356.447	4.303	30.267	4.303
DES	Proporción (DES:FM)	Área ( $\bar{x}$ )	$t$ calculada	$t_R$ ( $\bar{x}$ )	$t$ calculada
ChCl:Ur	50:50	1356.580	-0.035	30.268	0.495
	70:30	1359.563	-0.254	30.240	0.892
ChCl:Gly	50:50	1315.250	-0.718	30.224	1.318
	70:30	1288.767	3.092	30.217	1.342

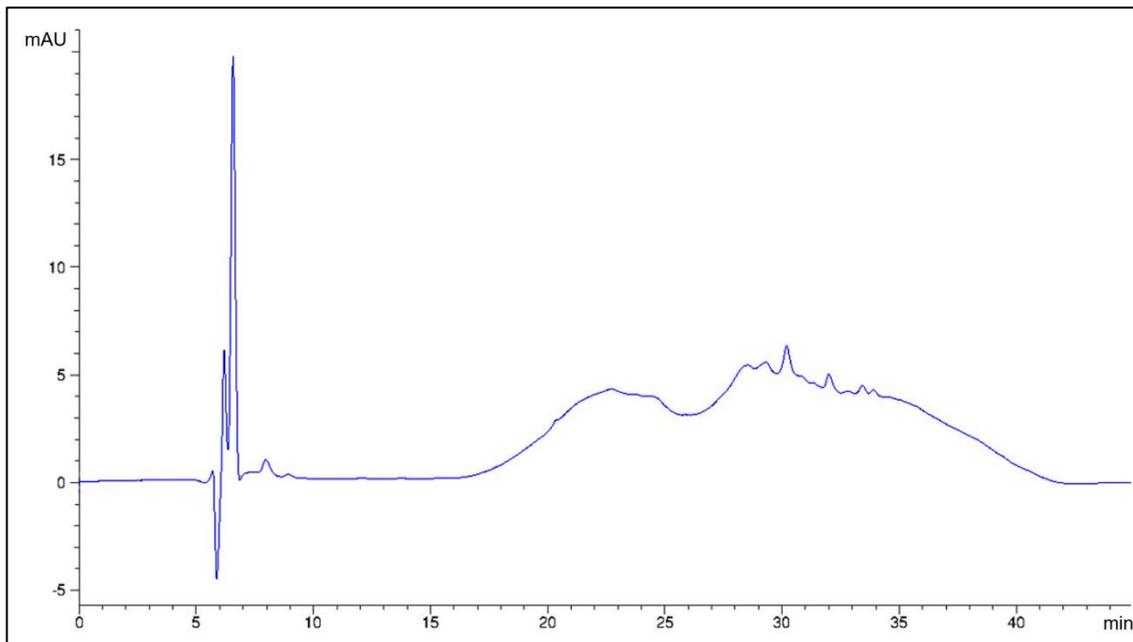
\*Análisis por triplicado.

\*\*FM = solución compuesta por etanol y solución acuosa de ácido acético al 0.1% (55:45).

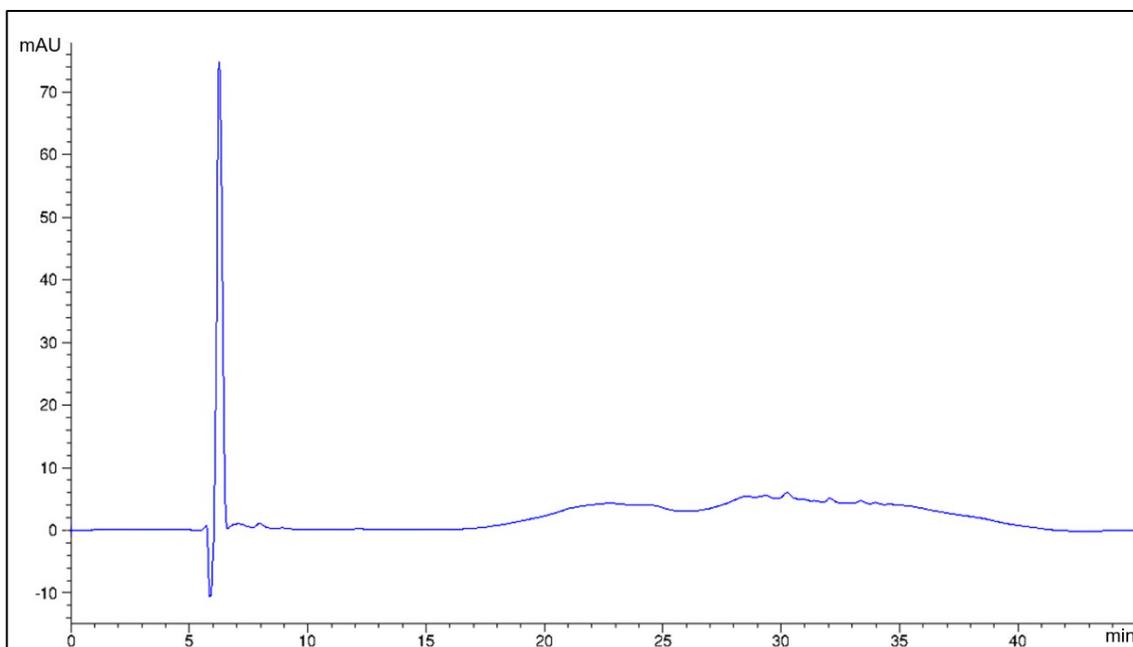
#### 6.4. Optimización de las condiciones de extracción de TBHQ, BHT y BHA por la técnica de LLME basada en DES en aceite vegetal.

##### 6.4.1. Selección de la matriz para la optimización.

En el análisis del aceite comestible puro de cártamo de la marca Oléico® bajo las condiciones de extracción previamente reportadas por W. Liu y colaboradores (W. Liu et al., 2017) y posterior análisis con el método cromatográfico validado, no se encontraron señales en los tiempos de retención de los analitos diana. En las Figuras 12 y 13 se muestran cromatogramas representativos obtenidos en estos experimentos.



**Figura 12.** Cromatograma obtenido bajo las condiciones mostradas en la Tabla II utilizando con fase extractantes el DES compuesto por ChCl:Gly(1:2).



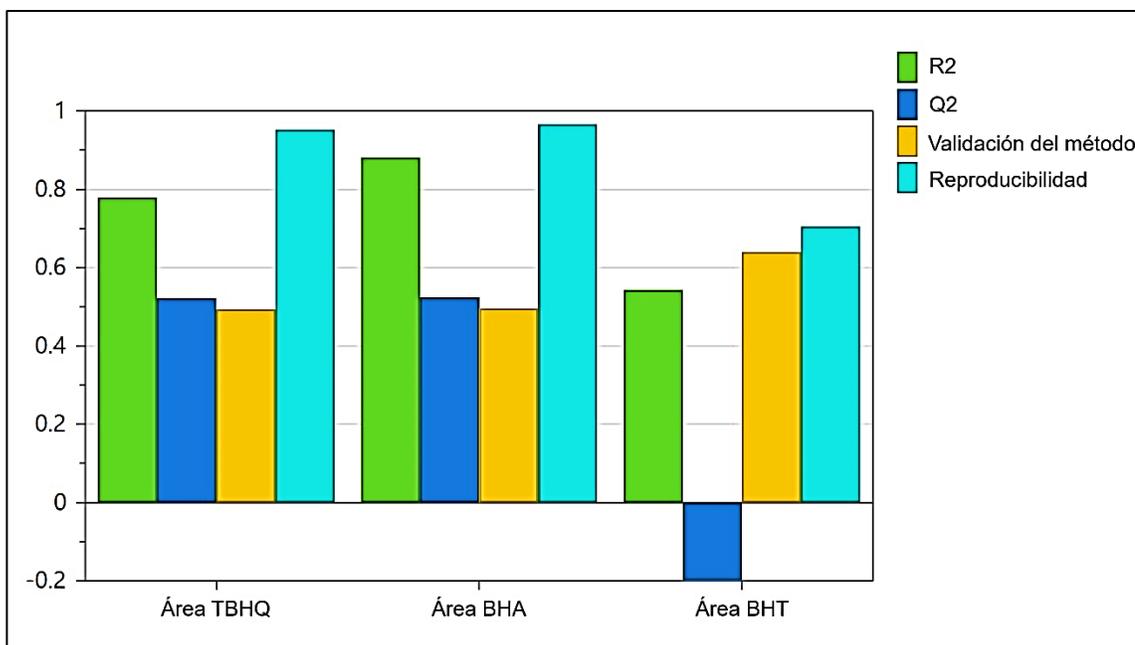
**Figura 13.** Cromatograma obtenido bajo las condiciones mostradas en la Tabla II utilizando con fase extractantes el DES compuesto por ChCl:Ur(1:2).

#### 6.4.2. Tamizaje de las condiciones de extracción.

Para evaluar el efecto y significancia de las variables probadas en la extracción de los analitos se realizó un diseño de experimentos de tipo factorial fraccionado  $2^{8-2}$  aleatorizado con 3 puntos centrales y sin bloques, el cual constó de un total de 67 experimentos de acuerdo con la matriz proporcionada por el programa MODDE 13. Los resultados de las áreas de picos cromatográficos obtenidos para cada analito en cada uno de los experimentos realizados se

tomaron como respuesta y se introdujeron en el programa MODDE, el cual estadísticamente mostró la relevancia de cada factor que se evaluó.

Con respecto a la evaluación del diseño experimental realizado, en la Figura 14 se presentan los resultados obtenidos del resumen del ajuste y validación del modelo para TBHQ, BHA y BHT. En relación con el parámetro  $R^2$  (bondad de ajuste) para el TBHQ fue 0.78, para el BHA 0.88 y para el BHT 0.54 por lo que se considera un buen resultado. Para la  $Q^2$ , esta debe ser mayor que 0.1 para un modelo significativo y mayor que 0.5 para un buen modelo por lo tanto podemos decir que solo el TBHQ y el BHA cumplen con lo anterior, mientras que el BHT no cumple con esto. La diferencia entre  $R^2$  y  $Q^2$  debería ser menor que 0.3 para un buen modelo y al compararlo con la gráfica se cumple con esto para el TBHQ y el BHA, por lo tanto, en este caso ambos modelos son buenos. Respecto a la validez del modelo para los tres casos es mayor que 0.25, por lo que no hay falta de ajuste. Por último, la reproducibilidad, la cual es la variación de la respuesta en las mismas condiciones (error puro) es mayor a 0.5 para los tres modelos y por lo tanto se puede decir que bajo las mismas condiciones la mayoría de los valores de la respuesta son idénticos.



**Figura 14.** Resumen de ajuste del modelo.

Con los resultados obtenidos, se realizó un análisis mediante el modelado con mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares Path Modeling, PLS-PM por sus siglas en inglés) y se construyó el gráfico de coeficiente para el efecto estandarizado de los factores evaluados para cada analito.

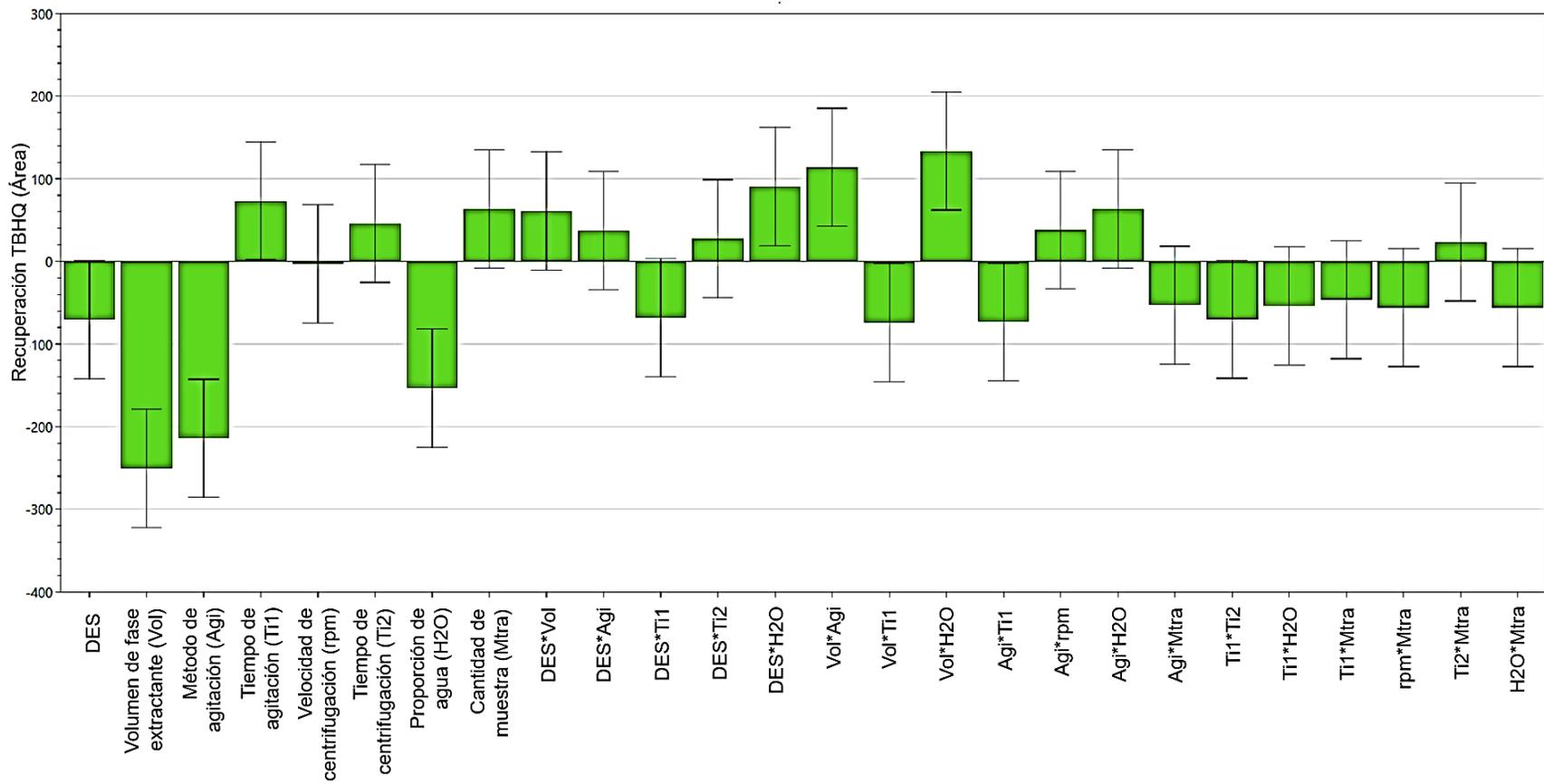
En estos gráficos se presentan las variables que tuvieron influencia significativa sobre la extracción, las cuales se identifican cuando la barra de significancia no cruza cero. Si estas variables son modificadas dentro del rango estudiado, se modificará la respuesta.

Como puede verse en la Figura 15, para el TBHQ las variables del volumen de la fase extractante (DES), proporción de agua, método de agitación y tiempo de agitación, tuvieron una influencia significativa para la extracción de dicho analito. Las interacciones entre variables que tuvieron influencia significativa fueron: el tipo de fase extractante (DES) con la proporción de agua, el volumen de la fase extractante (DES) con el método de agitación, el volumen de la fase extractante (DES) con la proporción de agua, el volumen de la fase extractante (DES) con el tiempo de agitación y el tiempo de agitación con el método de agitación.

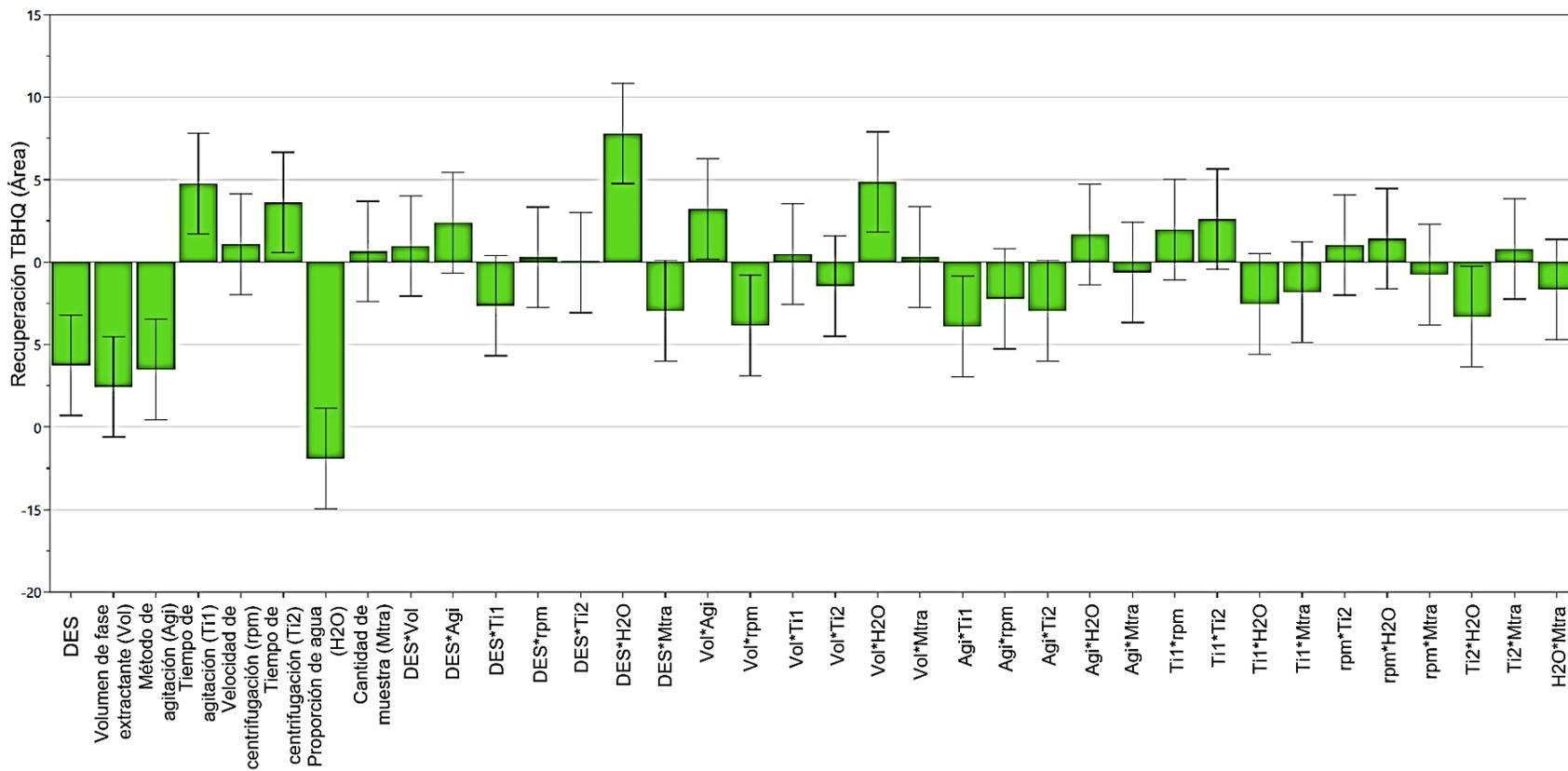
Como puede verse en la Figura 16, en lo que se refiere a BHA, las variables con influencia significativa fueron el tipo de fase extractante (DES), volumen de la fase extractante (DES), proporción de agua, método de agitación, tiempo de agitación y el tiempo de centrifugación. En cuanto a las interacciones entre las variables, las que tuvieron una influencia significativa, fueron el tipo de DES con la proporción de agua, el volumen de la fase extractante (DES) con el tiempo de agitación, el volumen de fase extractante (DES) con la proporción de agua, método de agitación con el tiempo de agitación y el tiempo de centrifugación con la proporción de agua.

Por otro lado, como puede verse en la Figura 17 para el BHT ninguna variable ni interacción entre variables tuvo una influencia significativa.

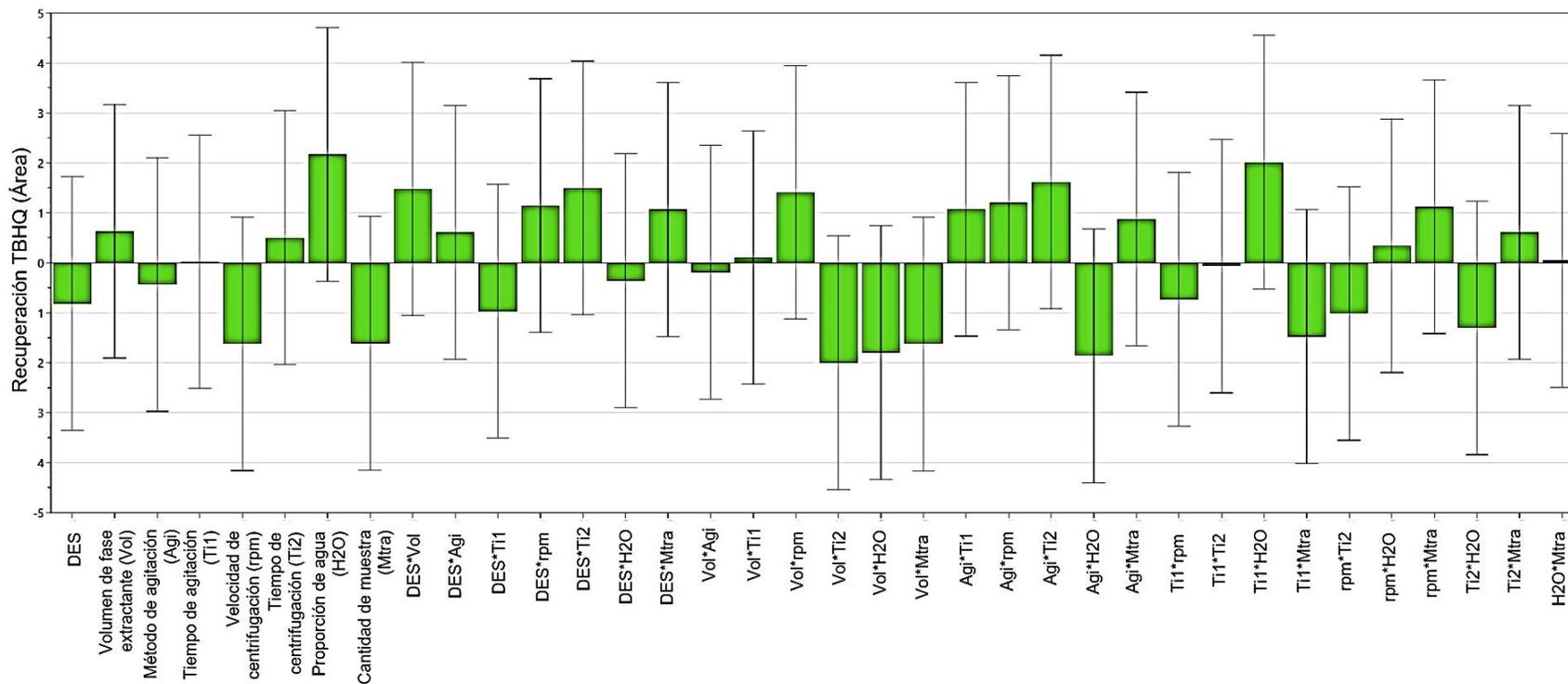
Los resultados que se obtuvieron del screening permitieron realizar un modelo de predicción, obteniendo gráficos de contorno que se pueden observar en las Figuras 18 y 19. En base a estos, podemos decir que, se maximiza la respuesta tanto para el BHA como para el TBHQ bajo los siguiente factores: tener una menor proporción de agua en la fase extractante (DES), utilizar un menor volumen de dicha fase, con un mayor tiempo de agitación, utilizar el vórtex como método de agitación, con el uso del DES compuesto por cloruro de colina y glicerol en proporción molar 1:2 y al aumentar el tiempo de centrifugación.



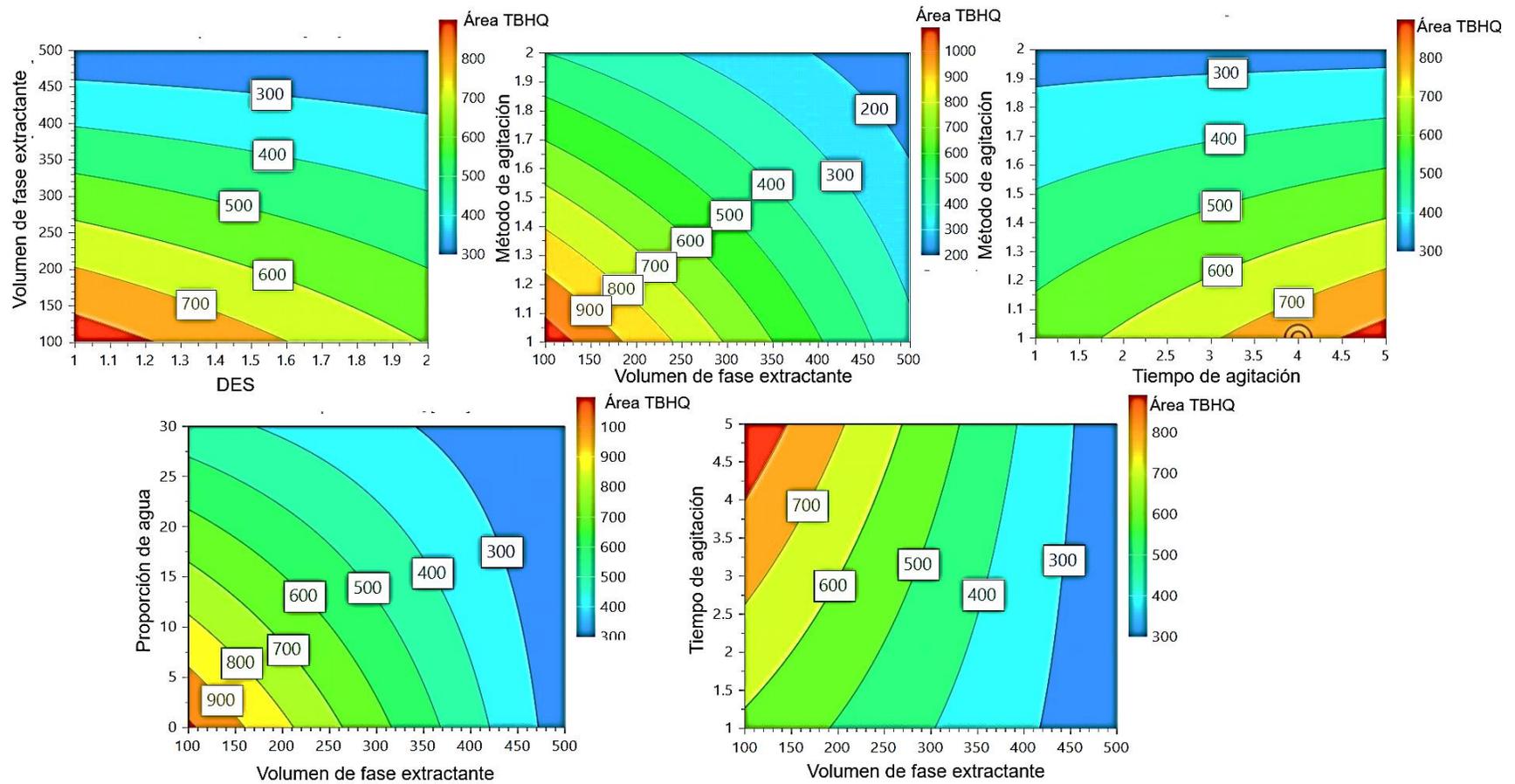
**Figura 15.** Gráficos de coeficiente para el efecto estandarizado de las variables evaluados en el diseño factorial fraccionado para el TBHQ.



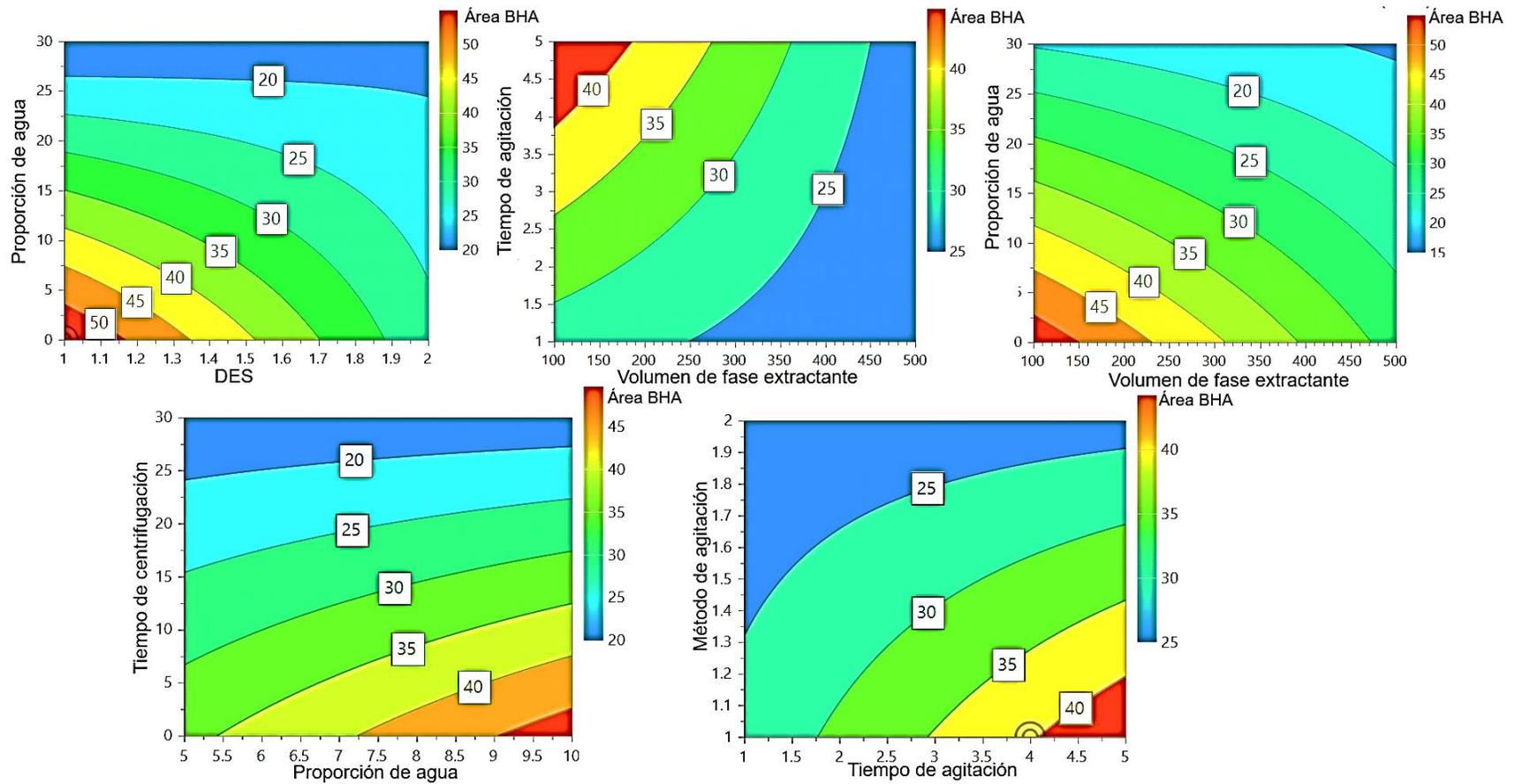
**Figura 16.** Gráficos de coeficiente para el efecto estandarizado de las variables evaluados en el diseño factorial fraccionado para el BHA.



**Figura 17.** Gráficos de coeficiente para el efecto estandarizado de las variables evaluados en el diseño factorial fraccionado para el BHT.



**Figura 18.** Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de tipo de DES, proporción de agua, volumen de fase extractante, tiempo de agitación y método de agitación para el TBHQ.

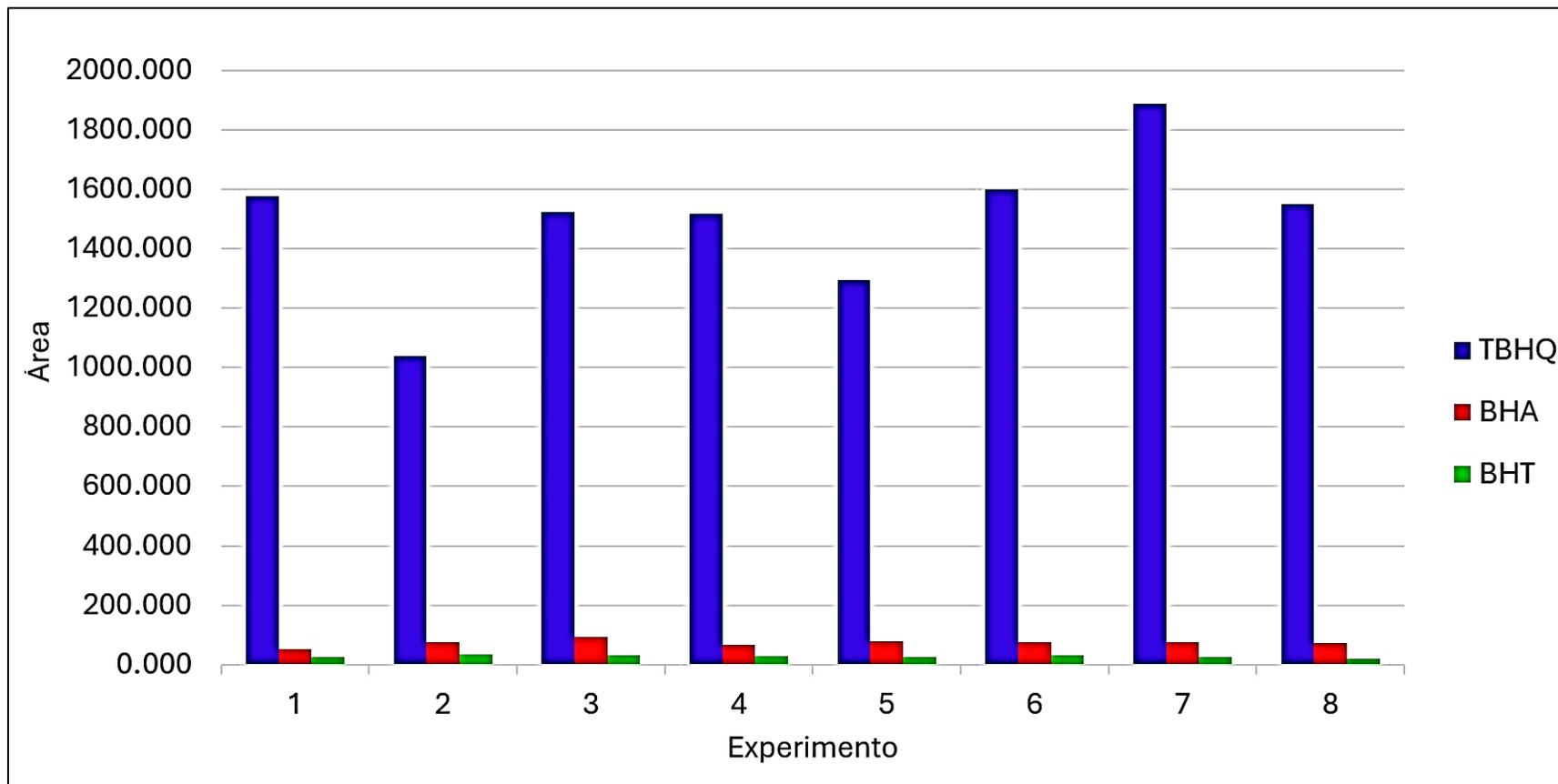


**Figura 19.** Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de tipo de DES, proporción de agua, volumen de fase extractante, tiempo de agitación y método de agitación para el BHA.

#### 6.4.3. Optimización de las condiciones de extracción.

Una vez identificados los factores que afectan de manera significativa la respuesta se procedió a realizar un diseño de experimentos de tipo simplex de múltiple descarte tomando en cuenta estos factores. Estos fueron el volumen de la fase extractante (DES), la proporción de agua en la fase extractante (DES), el tipo de fase extractante (DES), el método de agitación, el tiempo de agitación y el tiempo de centrifugación.

Se decidió establecer como condiciones fijas el tipo de fase extractante (DES) compuesto por cloruro de colina y glicerol, el vórtex como método de agitación y trabajar sin la adición de agua a la fase extractante. Por lo tanto, se procedió a evaluar el tiempo de agitación, el tiempo de centrifugación y el volumen de la fase extractante con el set de experimentos de la Tabla VI y los resultados de las respuestas cromatográficas obtenidas en los ocho experimentos se muestran en la Figura 20.

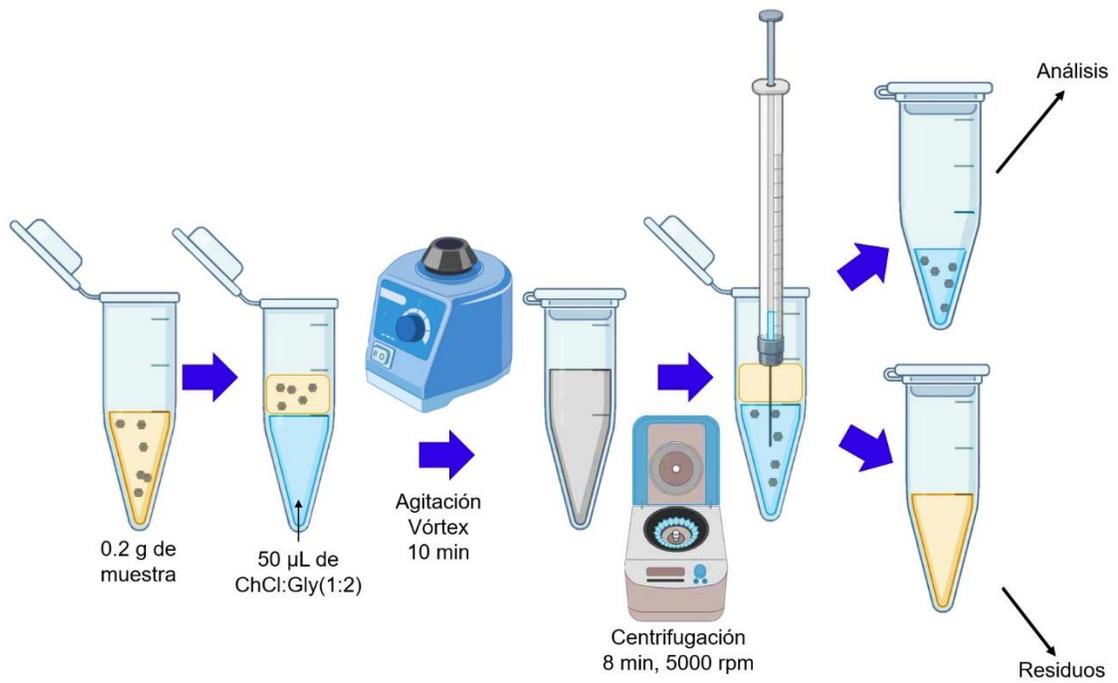


**Figura 20.** Resultados obtenidos del diseño simplex de múltiple para la optimización de la extracción.

Los resultados muestran que al utilizar 50  $\mu\text{L}$  de fase extractante, 10 min de agitación y 8 min de centrifugación se obtuvo una mayor respuesta de TBHQ, sin embargo, las respuestas de BHT y BHA, en todos los casos, fueron bajas. Las condiciones de extracción óptimas se muestran en la Tabla XV y en la Figura 21 se observa un esquema general del protocolo de microextracción con estas condiciones.

**Tabla XV.** Condiciones óptimas del método de LLME para la extracción de TBHQ en aceite vegetal comestible.

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
<b>Tipo de fase extractante (DES)</b>	ChCl:Gly (1:2)
<b>Volumen de fase extractante (DES)</b>	50 $\mu\text{L}$
<b>Proporción de H<sub>2</sub>O</b>	0%
<b>Cantidad de aceite (muestra)</b>	0.2 g
<b>Método de agitación</b>	Vórtex
<b>Tiempo de extracción</b>	10 min
<b>Velocidad de centrifugación</b>	5000 rpm
<b>Tiempo de centrifugación</b>	8 min

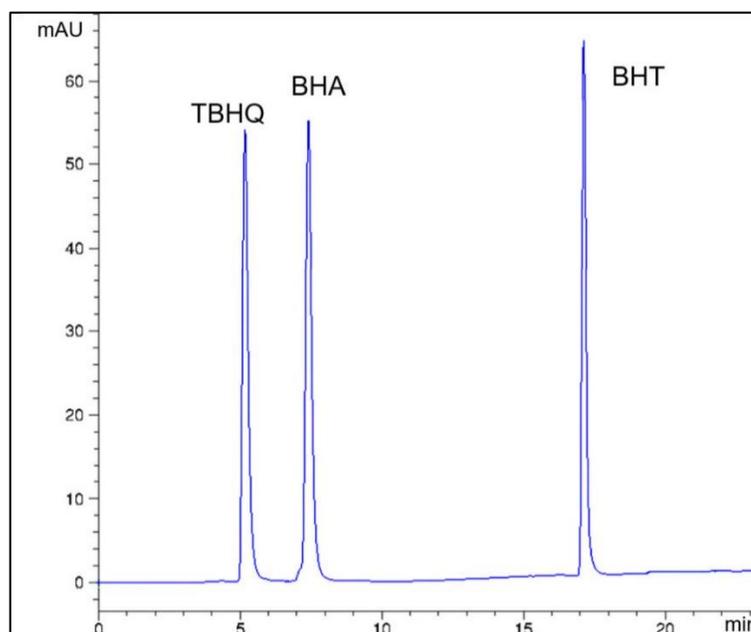


**Figura 21.** Protocolo de microextracción con las condiciones óptimas.

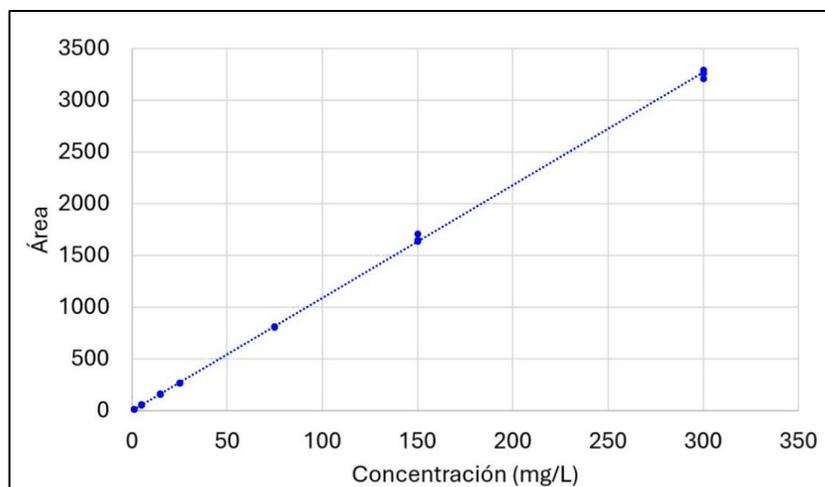
## 6.5. Evaluación del desempeño del método de extracción previamente optimizado y validado en muestras de aceite vegetal

### 6.5.1. Validación del método de microextracción líquido-líquido desarrollado.

El método desarrollado fue validado incluyendo los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación. Los resultados de la validación para las curvas de calibración en fase móvil, en hexano y en matriz después del proceso de extracción se presentan en las Tablas XVI, XVII y XVIII, respectivamente. Las curvas de calibración obtenidas se presentan en las Figuras 23, 24 y 25 respectivamente.



**Figura 22.** Cromatograma obtenido para una solución en mezcla de los analitos a 75 mg/L en fase móvil (etanol - ácido acético 0.1%, 60:40) bajo las condiciones de la Tabla VII.

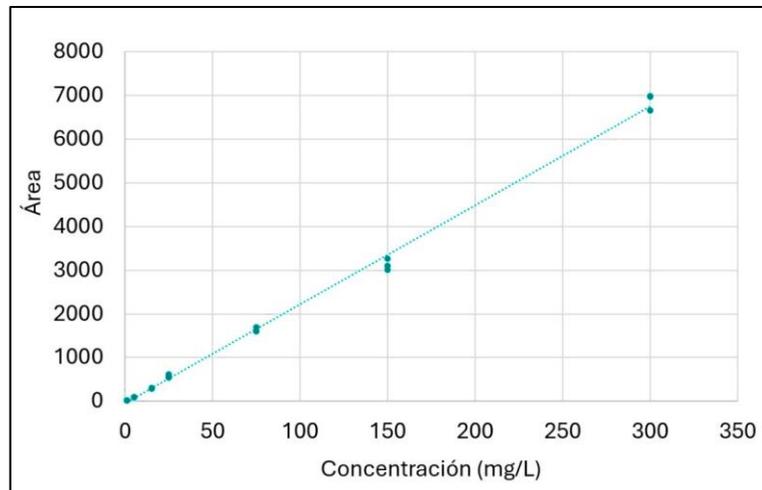


**Figura 23.** Curva de calibración en fase móvil para TBHQ.

**Tabla XV.** Resultados de la validación de la curva de calibración en fase móvil para TBHQ.

<b>Tiempo de retención (<math>t_R</math>, min)</b>		5.189±1.68
<b>Rango lineal</b>		1 - 300 mg/L
<b>Linealidad</b>	Ecuación de regresión	$y = 10.89x + 1.0981$
	$R^2$	0.999
	R	0.999
	%DER de factores de respuesta	2.173
<b>Precisión</b>	% DER de respuestas*	< 4.018
	% DER de $t_R$	1.680
<b>Exactitud</b>	Pendiente	0.9996
	$R^2$	0.9996
<b>Límite de detección</b>		0.013 mg/L
<b>Límite de cuantificación</b>		0.045 mg/L

\*%DER de las respuestas de cada nivel de concentración.

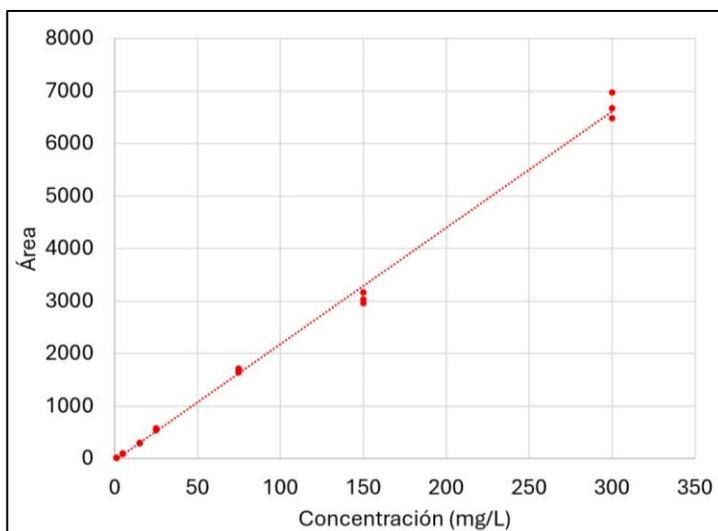


**Figura 24.** Curva de calibración en hexano para el TBHQ.

**Tabla XVII.** Resultados de la validación de la curva de calibración en hexano después del proceso de extracción para TBHQ.

<b>Tiempo de retención (<math>t_R</math>, min)</b>		5.208±0.062
<b>Rango lineal (mg/L)</b>		1 - 300
<b>Linealidad</b>	Ecuación de regresión	$y = 22.663x - 45.363$
	$R^2$	0.997
	R	0.999
	% DER de factores de respuestas	7.004
<b>Precisión</b>	% DER de respuestas*	< 4.233
	% DER de $t_R$	0.062
<b>Exactitud</b>	Pendiente	0.9971
	$R^2$	0.9971
<b>Límite de detección</b>		0.037 mg/L
		0.037 mg/kg
<b>Límite de cuantificación</b>		0.124 mg/L
		0.124 mg/kg

\*%DER de las respuestas de cada nivel de concentración.



**Figura 25.** Curva de calibración en matriz para TBHQ.

**Tabla XVIII.** Resultados de la validación de la curva de calibración en matriz después del proceso de extracción para TBHQ.

<b>Tiempo de retención (tr)</b>		5.218±0.116
<b>Rango lineal</b>		1 - 300 mg/L
<b>Linealidad</b>	Ecuación de regresión	$y = 22.143x - 30.811$
	$R^2$	0.997
	R	0.998
	% DER de factores de respuestas	6.821
<b>Precisión</b>	% DER de respuestas*	< 4.066
	% DER de tr	0.116
<b>Exactitud</b>	Pendiente	0.9966
	$R^2$	0.9966
<b>Límite de detección</b>		0.040 mg/L
		0.034 mg/kg
<b>Límite de cuantificación</b>		0.134 mg/L
		0.114 mg/kg

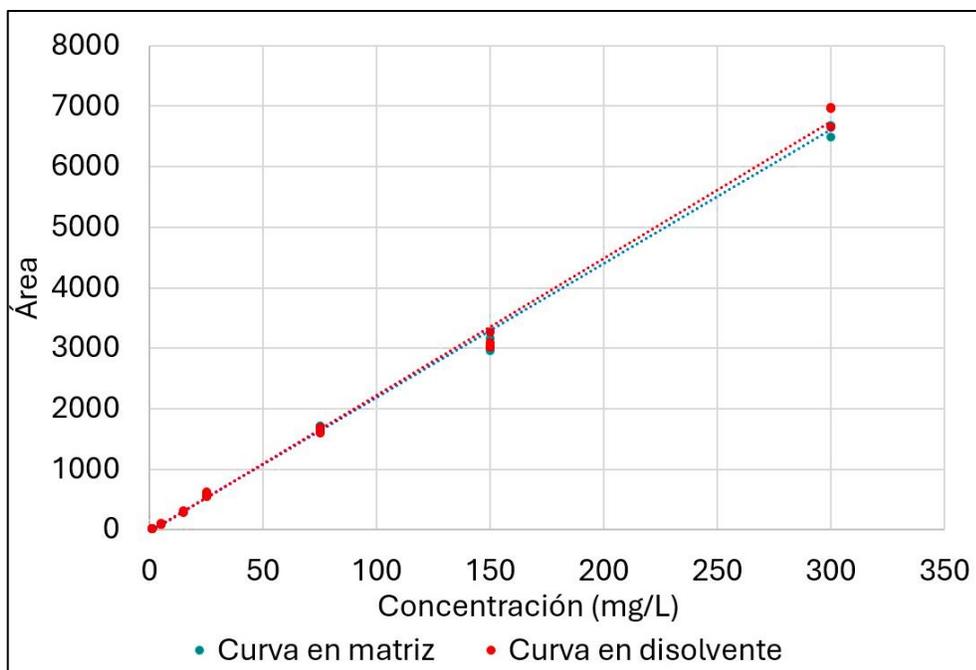
\*%DER de las respuestas de cada nivel de concentración.

Por último, se evaluó el efecto matriz, utilizando una prueba  $t$  para comparar las pendientes de las curvas de calibración y por medio del cálculo de porcentaje (%) de efecto matriz como se mencionó anteriormente en la metodología (Ecuación X).

De acuerdo con los datos de la Tabla XIX, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes de las curvas preparadas en hexano y matriz. Además, se encontró un porcentaje de efecto de matriz de 97.706 %. En la Figura 26, se presenta de manera gráfica la comparación de las curvas de calibración preparadas en hexano y en matriz después de la extracción bajo las condiciones establecidas como óptimas.

**Tabla XIX.** Resultados de la evaluación del efecto matriz.

<b>Prueba <math>t</math></b>				<b>%Efecto matriz</b>
Curva de calibración en matriz	Curva de calibración en hexano	<b><math>t</math> crítica</b>	<b><math>t</math> calculada</b>	
Pendiente ( $\bar{x}$ )	Pendiente ( $\bar{x}$ )			
22.143	22.663	2.776	-0.860	97.706%



**Figura 26.** Curvas de calibración en hexano y en matriz después de la extracción bajo las condiciones óptimas.

#### 6.5.2. Evaluación del desempeño analítico del método propuesto.

Se realizó la evaluación del desempeño del método analítico mediante el análisis de muestras añadidas de aceite vegetal comestible (libre de antioxidantes fenólicos sintéticos) a tres niveles de concentración. En la Tablas XX y XXI se encuentran los resultados correspondientes a la precisión y exactitud, respectivamente.

**Tabla XX.** Resultados correspondientes a la precisión del desempeño analítico del método desarrollado.

Nivel adicionado		Precisión							
		Intradía				Interdía			
		Concentración calculada promedio $\pm$ D.S.*	%DER**	$t_R^{***}$ promedio $\pm$ D.S.* (min)	%DER**	Concentración calculada promedio $\pm$ D.S.*	%DER**	$t_R^{***}$ promedio $\pm$ D.S.* (min)	%DER**
<b>Nivel bajo</b>	10 mg/L	9.809 $\pm$ 0.272	2.770	5.203 $\pm$ 0.001	0.022	9.999 $\pm$ 0.385	3.851	5.198 $\pm$ 0.011	3.851
	10.89 mg/kg	9.723 $\pm$ 0.322	3.310			9.948 $\pm$ 0.456	4.585		
<b>Nivel medio</b>	100 mg/L	100.587 $\pm$ 2.030	2.018	5.199 $\pm$ 0.099	0.164	99.273 $\pm$ 3.528	3.553	5.193 $\pm$ 0.013	3.553
	108.90 mg/kg	117.249 $\pm$ 2.405	2.051			115.693 $\pm$ 4.178	3.612		
<b>Nivel alto</b>	200 mg/L	200.755 $\pm$ 4.043	2.014	5.206 $\pm$ 0.019	0.019	200.747 $\pm$ 6.836	3.405	5.194 $\pm$ 0.015	3.405
	217.80 mg/kg	235.893 $\pm$ 4.789	2.030			235.888 $\pm$ 8.098	3.433		

\*D.S. = Desviación estándar.

\*\*%DER = Porcentaje de desviación estándar relativa.

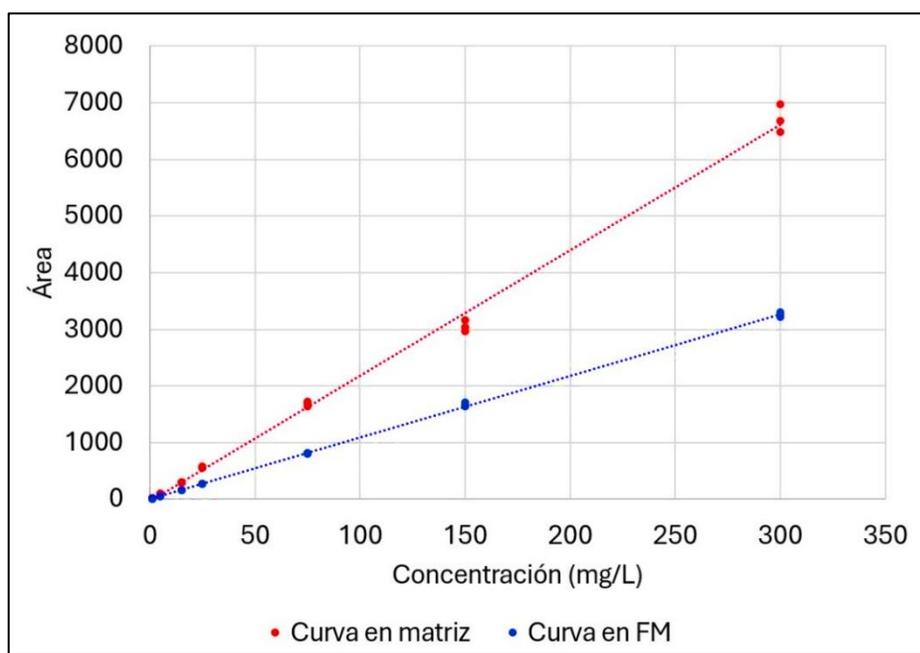
\*\*\*  $t_R$  = tiempo de retención.

**Tabla XVI.** Resultados correspondientes a la exactitud del desempeño analítico del método desarrollado.

Nivel adicionado		Exactitud			
		Intradía		Interdía	
		Concentración calculada promedio $\pm$ D.S.*	Recuperación (%)	Concentración calculada promedio $\pm$ D.S.*	Recuperación (%)
<b>Nivel bajo</b>	10 mg/L	9.809 $\pm$ 0.272	97.993	9.999 $\pm$ 0.385	99.886
	10.89 mg/kg	9.723 $\pm$ 0.322	88.810	9.948 $\pm$ 0.456	90.860
<b>Nivel medio</b>	100 mg/L	100.587 $\pm$ 2.030	100.492	99.273 $\pm$ 3.528	99.180
	108.90 mg/kg	117.249 $\pm$ 2.405	107.340	115.693 $\pm$ 4.178	105.916
<b>Nivel alto</b>	200 mg/L	200.755 $\pm$ 4.043	100.276	200.747 $\pm$ 6.836	100.272
	217.80 mg/kg	235.893 $\pm$ 4.789	107.832	235.888 $\pm$ 8.098	107.828

\*D.S. = Desviación estándar.

Para la eficiencia de la extracción se evaluó el factor de enriquecimiento. El resultado obtenido fue de 2.03, lo cual nos indica que se logró preconcentrar el TBHQ. De igual forma se presenta de manera grafica la comparación de las curvas de calibración preparadas en fase móvil sin extracción y en matriz después de la extracción en la Figura 27.

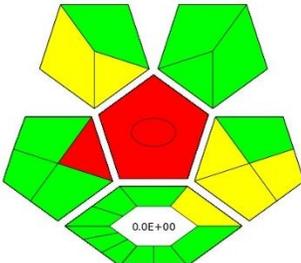


**Figura 27.** Curvas de calibración en fase móvil sin extracción (azul) y en matriz después de la extracción (rojo).

### 6.5.3. Evaluación ecológica del método propuesto.

Por último, se realizó una evaluación ecológica del método desarrollado mediante tres escalas ecológicas, Analytical Eco-Scale, GAPI y AGREE. Los resultados del método desarrollado, así como de otros métodos analíticos propuestos para la extracción de TBHQ en aceite vegetal comestible se muestran en la Tabla XXII. Estos resultados muestran que el método propuesto tiene un buen rendimiento ecológico incluso mejor que otras metodologías reportadas anteriormente.

**Tabla XXII.** Evaluación ecológica del método de extracción propuesto y comparación con otros métodos reportados.

Analytical Eco-Scale			GAPI	AGREE
<b>Método de extracción propuesto</b>				
<b>Reactivos</b>	Etanol	4		
	Ácido acético	4		
<b>Instrumentos</b>	CLAR	1		
	Sonicador	1		
	Baño de agua Termostático	0		
	Vórtex	0		
	Centrifuga	1		
<b>Riesgo laboral</b>	Hermetización del proceso analítico.	0		
<b>Gasto</b>	1-10 ml	3		
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>14</b>		
<b>Eco-Scale</b>		<b>86</b>		

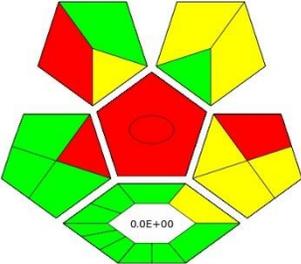
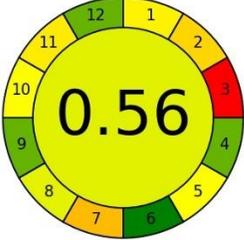
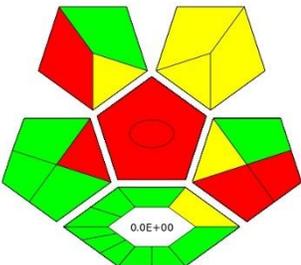
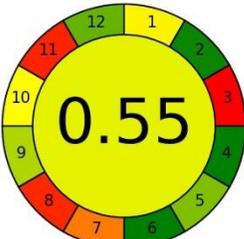
**Tabla XXII.** Evaluación ecológica del método de extracción propuesto y comparación con otros métodos reportados.

Analytical Eco-Scale			GAPI	AGREE
<b>Método de extracción de la AOAC (1995)</b>				
<b>Reactivos</b>	Acetonitrilo	4		
	Hexano	6		
	Ácido acético	4		
	Metanol	6		
	Propanol	4		
<b>Instrumentos</b>	CLAR	1		
	Baño de agua Termostático	0		
	Rotavapor	0		
<b>Riesgo laboral</b>	Emisión de vapores a la atmosfera	3		
<b>Gasto</b>	>10 ml	5		
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>33</b>		
<b>Eco-Scale</b>		<b>67</b>		
<b>Método de extracción reportado (W. Liu et al., 2017)</b>				
<b>Reactivos</b>	Metanol	6		
	Ácido acético	4		
	Hexano	6		
<b>Instrumentos</b>	CLAR	1		
	Sonicador	0		
	Baño de agua termostático	0		
	Centrifuga	1		
<b>Riesgo laboral</b>	Emisión de vapores a la atmosfera	3		
<b>Gasto</b>	>10 ml	5		
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>26</b>		
<b>Eco-Scale</b>		<b>74</b>		

**Tabla XXII.** Evaluación ecológica del método de extracción propuesto y comparación con otros métodos reportados.

Analytical Eco-Scale			GAPI	AGREE
<b>Método de extracción reportado (W. Liu, Zong, et al., 2018)</b>				
<b>Reactivos</b>	Metanol	6		
	Ácido acético	4		
<b>Instrumentos</b>	CLAR	1		
	Sonicador	0		
	Baño de agua Termostático	0		
	Centrifuga	1		
<b>Riesgo laboral</b>	Hermetización del proceso analítico.	0		
<b>Gasto</b>	>10 ml	5		
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>17</b>		
<b>Eco-Scale</b>		<b>83</b>		
<b>Método de extracción reportado (W. Liu, Zhang, et al., 2018)</b>				
<b>Reactivos</b>	Metanol	6		
	Ácido acético	4		
	Hexano	6		
<b>Instrumentos</b>	CLAR	1		
	Sonicador	0		
	Baño de agua termostático	0		
	Centrifuga	1		
<b>Riesgo laboral</b>	Emisión de vapores a la atmosfera	3		
<b>Gasto</b>	>10 ml	5		
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>26</b>		
<b>Eco-Scale</b>		<b>74</b>		

**Tabla XXII.** Evaluación ecológica del método de extracción propuesto y comparación con otros métodos reportados.

Analytical Eco-Scale			GAPI	AGREE
<b>Método de extracción reportado (Mogaddam et al., 2021)</b>				
<b>Reactivos</b>	Hidróxido de sodio	2		
	Cloruro de tetrabutilamonio	1		
<b>Instrumentos</b>	CG-FID	1		
	Baño de agua termostático	0		
	Centrifuga	1		
<b>Riesgo laboral</b>	Emisión de vapores a la atmosfera	3		
<b>Gasto</b>	1-10 ml	3		
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>10</b>		
<b>Eco-Scale</b>		<b>90</b>		
<b>Método de extracción reportado (W. Liu et al., 2022)</b>				
<b>Reactivos</b>	Metanol	6		
	Ácido acético	4		
<b>Instrumentos</b>	CLAR	1		
	Baño de agua termostático	0		
	Centrifuga	1		
<b>Riesgo laboral</b>	Hermetización del proceso analítico.	0		
<b>Gasto</b>	>10 ml	5		
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>17</b>		
<b>Eco-Scale</b>		<b>83</b>		

**Tabla XXII.** Evaluación ecológica del método de extracción propuesto y comparación con otros métodos reportados.

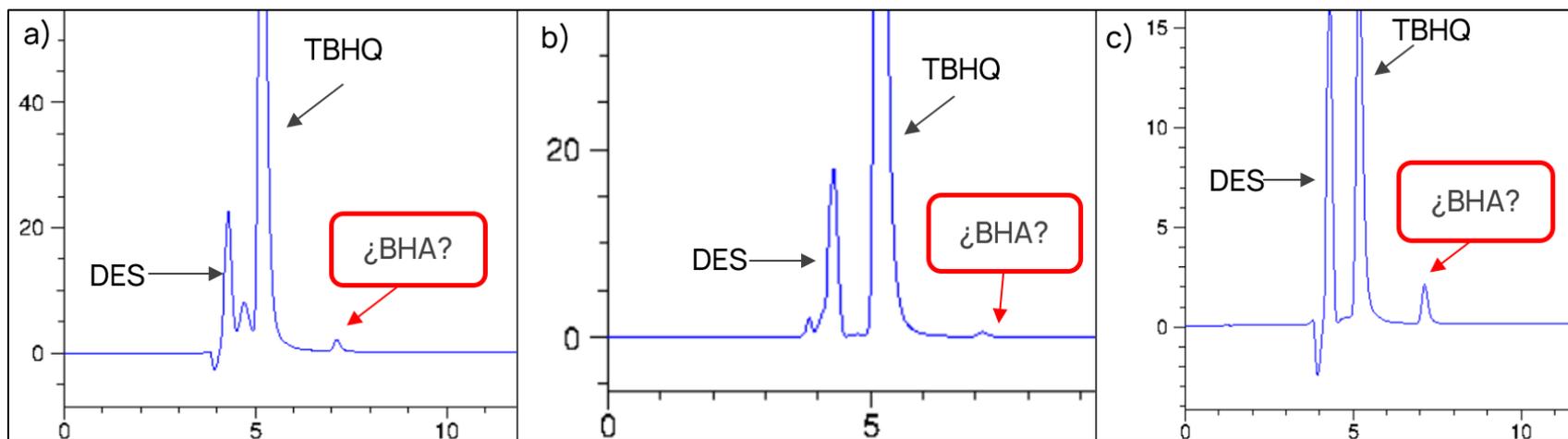
<b>Método de extracción reportado (Cao et al., 2024)</b>			
<b>Reactivos</b>	Metanol	6	
	Ácido acético	4	
<b>Instrumentos</b>	CLAR	1	
	Sonicador	0	
	Baño de agua Termostático	0	
	Centrifuga	1	
<b>Riesgo laboral</b>	Hermetización del proceso analítico.	0	
<b>Gasto</b>	>10 ml	5	
<b>Total de puntos de penalización</b>		<b>17</b>	
<b>Eco-Scale</b>		<b>83</b>	

#### 6.5.4. Aplicación del método de extracción propuesto.

El método desarrollado se aplicó en el análisis de tres diferentes muestras comerciales de aceite vegetal comestible. Los resultados encontrados se muestran en la Tabla XXIII. En la Figura 28 se presentan cromatogramas representativos correspondientes a cada una de las muestras analizadas. Como puede verse en los cromatogramas, además de la señal correspondiente al TBHQ, también aparece una señal en el tiempo de retención del BHA.

**Tabla XXIII.** Resultados obtenidos del TBHQ en el análisis de muestras reales.

<b>Muestra</b>			
<b>Marca</b>	Mazola	Vita premium	Kartamus
<b>Origen vegetal</b>	Maíz	Soya	Mezcla de canola, soya, girasol y cártamo
<b>Contenido reportado en la etiqueta</b>	TBHQ: 0.01%	TBHQ: 0.01%	TBHQ: <0.02%
<b>%TBHQ encontrado</b>	0.014%	0.014%	0.003%



**Figura 28.** Cromatogramas obtenidos de la extracción de muestras de aceite vegetal comerciales de las marcas: a) Mazola (maíz); b) Vita Premium (soya); c) Kartamus (mezcla de canola, soya, girasol y cártamo).

## **CAPÍTULO 7**

### **DISCUSIÓN**

#### **7.1. Diseño y caracterización de los DES utilizando cloruro de colina como HBA.**

La matriz objetivo (aceite vegetal) en este trabajo es oleosa y no polar, por lo tanto, se debe utilizar una fase extractante inmisible en esta (polar), para poder llevar a cabo el principio fundamental de la extracción líquido-líquido

(Poole, 2020). Debido a lo anterior, en este trabajo, se sintetizaron dos DES hidrófilos o de naturaleza polar, utilizando cloruro de colina como HBA y glicerol o urea como HBD, los cuales se probaron como fases extractantes. Se seleccionaron estos compuestos porque se ha descrito que forman mezclas eutécticas hidrofílicas o polares y fácilmente biodegradables (Ozturk et al., 2018). La relación molar de cloruro de colina fue siempre 1, mientras que las relaciones de glicerol y urea siempre fue 2. El proceso de síntesis de DES fue sencillo, los DES formados (cloruro de colina y urea, 1:2 y cloruro de colina y glicerol, 1:2) siempre fueron líquidos transparentes y no se observó formación de cristales. Estos resultados son congruentes con los reportados en trabajos anteriores (Esfahani et al., 2020; Jakovljević et al., 2020; Wojeicchowski et al., 2021).

Los espectros de IR de los DES y de sus componentes fueron obtenidos y comparados con espectros reportados en la literatura. En este análisis, al comparar los espectros obtenidos de los DES con los espectros de los correspondientes compuestos que los conforman se observó que no hay presencia de nuevas señales, que algunas de las señales se han desplazado debido a las interacciones entre los componentes y que otras se solapan.

En el caso del cloruro de colina, el cual es un componente común de ambos DES, podemos observar señales características como la banda ancha entre 3200 y 3560  $\text{cm}^{-1}$ , la cual corresponde al estiramiento O—H (Perkins et al., 2013).

Otras señales identificadas son los picos alrededor de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a tensiones de los enlaces C—H, la señal en  $1482\text{ cm}^{-1}$  puede deberse a vibraciones por la flexión C—H, y las bandas en  $958\text{ cm}^{-1}$  y  $1084\text{ cm}^{-1}$  se pueden considerar como vibraciones por el estiramiento del enlace C—O (Li et al., 2015).

Por otro lado, la urea presenta los picos característicos de una amina primaria, estos se encuentran en  $3450$  y  $3335\text{ cm}^{-1}$  y corresponden a los estiramientos simétrico y asimétrico del enlace N—H (Perkins et al., 2013). Otra banda característica, corresponde al estiramiento del doble enlace C=O, esta se observa en  $1676\text{ cm}^{-1}$ . Por último, podemos observar dos bandas que se encuentran muy cercanas, tanto que forman una sola banda en  $1600$  y  $1590\text{ cm}^{-1}$ , estas corresponden a las vibraciones de deformación del enlace N—H (Manivannan & Rajendran, 2011).

En cuanto al glicerol, en el espectro obtenido se tiene una banda ancha en  $3297\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde al estiramiento O—H (Guimarães et al., 2016).

El espectro del DES constituido por cloruro de colina y glicerol (1:2) presenta señales correspondientes a los componentes individuales lo cual nos indica que se formó la mezcla eutéctica de dichos compuestos. Entre estas señales se observa la banda que corresponde al estiramiento O—H (Li et al., 2015).

Por otro lado, el espectro del DES formado por cloruro de colina y urea (1:2) muestra que se siguen presentando vibraciones de estiramientos del enlace O—H. Es posible que las bandas correspondientes a los estiramientos simétrico y asimétrico del enlace N—H estén siendo solapadas por la banda del O—H, debido a que los hidrógenos están involucrados en enlaces de hidrógeno más fuertes. Se han reportado que las bandas correspondientes a la deformación del enlace N—H pueden estar en resonancia de Fermi con un alguno de los tipos de estiramiento del enlace N—H, por lo que se pueden observar sobretonos. Posiblemente la banda en  $1611\text{ cm}^{-1}$  sea un resultado de lo anterior, presentándose una mejora de la intensidad y un cambio a números de onda más bajos (Perkins et al., 2013).

## **7.2 Desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.**

Los métodos reportados para la cuantificación de TBHQ, BHA y BHT emplean columnas de fase inversa C18 y una fase móvil compuesta por una solución acuosa con ácido, como el ácido acético (AOAC, 1995) o ácido fórmico (Wl Liu et al., 2017), y un disolvente orgánico como el metanol (W. Liu et al., 2018). Sin embargo, con la introducción de la Química Verde se han buscado estrategias para tener métodos cromatográficos ecológicos. En general se considera que la cromatografía líquida es menos ecológica que la cromatografía de gases debido al uso de disolventes para la separación del o los analitos (Płotka et al., 2013). Por esta razón, en CLAR de fase inversa, se han buscado alternativas más verdes para los componentes de la fase móvil, uno de estas es el etanol (Spiegelun et al., 2013). El etanol posee propiedades parecidas al acetonitrilo y al metanol, sin embargo, dentro de sus características destaca la toxicidad más baja, así como menores costos para su eliminación y su adquisición (Yabré et al., 2018). Es por esta razón que se decidió explorar el rendimiento de este disolvente como componente de la fase móvil del método cromatográfico desarrollado, con el fin de obtener un método lo más ecológico posible.

Como columna para llevar a cabo la separación se probó una columna Kinetex C18, la cual tiene como característica el poseer una fase estacionaria

con la tecnología core-shell (partícula sólida y recubierta porosa), lo cual hace que se use un menor flujo de fase móvil para la separación y, por lo tanto, un menor gasto de disolventes (Y. Liu et al., 2021; Preti, 2016). Sin embargo, estas columnas y el uso de etanol generan altas presiones en el sistema cromatográfico, por eso se decidió trabajar a 45 °C para mantener una presión relativamente baja en el sistema (Assassi et al., 2015; Ibrahim et al., 2020).

Se probaron diferentes gradientes de la fase móvil, manteniendo constante el flujo a 0.1 mL/min y utilizando un volumen de inyección de 2 µL. Se trabajó con el cromatógrafo Agilent 1100 con detector UV de longitud de onda variable realizando la detección a 280 nm. Esta longitud de onda se seleccionó porque los compuestos presentaban una absorción adecuada que permite una distinción cromatográfica de la señal correspondiente a cada analito (AOAC, 1995).

Por otro lado, se decidió evaluar como aditivo al componente acuoso de la fase móvil el ácido fórmico y el ácido acético, debido a que hay reportes en la literatura donde se han utilizado previamente para la determinación de los analitos.

Utilizando tanto el ácido fórmico como el ácido acético se encontró una resolución mayor a 1.5, por lo que se considera que fue buena (Zumbado Fernández, 2021). No obstante, en ambos casos, se observó una importante deriva de la línea base. El ácido acético se ha considerado como un disolvente relativamente ecológico, además, de ser menos tóxico que el ácido fórmico (Tobiszewski et al. 2017). Debido a lo anterior, se decidió utilizar el ácido acético

como aditivo a la fase acuosa de la fase móvil, y de los métodos desarrollados se seleccionó el método con menor deriva de la línea base y un menor tiempo de análisis. Utilizando el método seleccionado se obtuvo una resolución entre el TBHQ y el BHA de 25.6 y entre el BHA y BHT de 37.3, por lo que se tiene una buena separación cromatográfica de los analitos (Zumbado Fernández, 2021).

La deriva de la línea base observada es provocado por el etanol, ya que una de las principales desventajas del uso de este disolvente es que el corte de longitud de onda UV es mayor al del metanol y el acetonitrilo (Yabré et al., 2018), provocando un aumento en la línea base. A pesar de esto, se observó que no interfiere con la cuantificación de los analitos ya que al validar el método cromatográfico se obtuvo que fue lineal, preciso y exacto. Con el fin de disminuir este efecto al máximo se probaron diferentes gradientes de la fase, obteniendo un mejor resultado, es decir, una línea base menos pronunciada con las condiciones cromatográficas presentadas anteriormente en la Tabla X.

### **7.3. Validación del sistema cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHT y BHA.**

Los resultados obtenidos durante la validación del método cromatográfico se presentan en la tabla XI.

En cuanto a la linealidad se decidió trabajar en un rango de 15 a 300 mg/ L para todos los analitos. Esta se evaluó en base a una inspección visual de la curva de calibración obtenida; el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y de correlación (R) obtenidos a partir del análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados; y el %DER de los factores de respuesta obtenidos en cada nivel de concentración de la curva de calibración. En cuanto a la inspección visual, se observó una tendencia lineal para las tres curvas de calibración correspondientes a los analitos. Tanto los coeficientes de determinación como los de correlación fueron mayores a 0.99 y 0.995, respectivamente (Castro et al., 2020). Por último, los %DER de los factores de respuesta obtenidos fueron menores al 15% (Portillo et al., 2022). Debido a los resultados anteriores se considera que el método fue lineal para todos los analitos en el intervalo propuesto.

La precisión fue evaluada como el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de las respuestas obtenidas y de los tiempos de retención para todos los analitos. Para esto se tomaron en cuenta los criterios de aceptación para la validación de un método analítico establecidos en la AOAC, siendo el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) menor de un 5.3%. Como puede verse en la tabla XI, los valores de %DER de las respuestas encontrados para el TBHQ fueron de menores a 2.885%, para el BHA menores a 2.037% y para el BHT menores a 2.549%. En el caso de los %DER de los  $t_R$  encontrados para el TBHQ de 0.204%, para el BHA 0.138% y para el BHT de 0.042%. En

todos los casos se encontró un porcentaje menor al 5.3%, lo cual quiere decir que el método cromatográfico es preciso.

La exactitud se evaluó mediante la correlación de la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real, obteniendo en todos los casos la ecuación de la recta resultante y haciendo la evaluación con el valor de la pendiente y el del coeficiente de determinación. Para todos los analitos, el análisis de correlación arrojó valores de la pendiente alrededor de 1, con un coeficiente de determinación mayor a 0.99, por lo tanto, el método es exacto.

Los límites de cuantificación y de detección fueron calculados en base a la relación S/N. Para el TBHQ el límite de cuantificación fue de 3.59 mg/L mientras que el límite de detección obtenido fue de 1.08 mg/L. Para el BHA los límites de detección y de cuantificación calculados fueron de 0.69 mg/L y 2.29 mg/L, respectivamente. Por último, en el caso del BHT se obtuvieron resultados de 2.42 mg/L y 8.06 mg/L para los límites de detección y de cuantificación respectivamente.

Por último, para poder determinar si existe alguna interferencia cromatográfica en la separación y cuantificación de los analitos por parte de los DES, se evaluó el efecto de soluciones compuestas por los DES utilizados como

fases extractantes y por fase móvil. Se probaron dos proporciones de 50:50 y 70:30 de cada DES (cloruro de colina con urea y cloruro de colina con glicerol) y fase móvil, respectivamente. Estas proporciones de los DES y la fase móvil, se evaluaron en una concentración final de 100 mg/L de cada antioxidante, y se inyectaron por triplicado al cromatógrafo. A las áreas y los tiempos de retención obtenidos se les realizó una prueba estadística *t* de Student de dos colas, con un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ), para comparar las medias. Estos resultados, mostrados anteriormente en la Tabla XII, nos indican que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la separación y en las respuestas obtenidas de los analitos cuando hay presencia de ambos DES en de las proporciones evaluadas. Por lo que podemos inferir que al estar presentes los DES en las soluciones que se inyectan al cromatógrafo, no hay interferencia cromatográfica en la cuantificación de los analitos.

#### **7.4. Optimización de las condiciones de extracción de TBHQ, BHT y BHA por la técnica de LLME basada en DES en aceite vegetal.**

Para poder llevar a cabo el proceso de optimización del método de microextracción, es necesario contar con una matriz libre de los compuestos diana de este trabajo (Afshar Mogaddam et al., 2021). Para lo anterior, se analizaron muestras por triplicado de aceite (aceite comestible puro de cártamo de la marca Oléico<sup>®</sup>) que no reporta en su etiqueta la presencia de TBHQ, BHA ni BHT. La extracción de las muestras se realizó mediante la metodología

propuesta por W. Liu y colaboradores (W. Liu et al., 2017). Como puede verse en las Figuras 12 y 13, no se encontró señal cromatográfica en los tiempos de retención de los compuestos estudiados en dichas muestras. Por lo tanto, se decidió utilizar este aceite como matriz blanco para la optimización del método de microextracción líquido-líquido planteado.

Para la primera etapa de la optimización, con el fin de realizar un tamizaje de las variables de extracción con influencia significativa en la eficiencia de la extracción de los analitos, se procedió a realizar un diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{8-2}$  aleatorizado con 3 puntos centrales y sin bloques, el cual constó de un total de 67 experimentos de acuerdo con la matriz proporcionada por el programa MODDE 13. En base a reportes en la literatura, se establecieron las variables a evaluar, con un nivel bajo y alto (Çabuk et al., 2019; W. Liu et al., 2017; W. Liu, Zong, et al., 2018). Esta información se puede observar en la Tabla III.

De acuerdo con los parámetros de validación y ajuste del modelo planteado (Figura 14), se puede mencionar que el modelo del diseño experimental posee un buen ajuste para los analitos estudiados (TBHQ, BHA y BHT). Respecto al parámetro  $R^2$  (bondad de ajuste), para el TBHQ se obtuvo un valor de 0.78, para el BHA 0.88 y para el BHT 0.54, por lo que se considera un buen resultado. Ya que este parámetro es una medida de ajuste, que indica que los modelos se ajustan bien a los datos encontrados y que posee una buena predicción para resultados de nuevos experimentos. Para el parámetro  $Q^2$ , el cual es el porcentaje de variación de la respuesta predicha por el modelo de acuerdo con

la validación cruzada, y nos indica el poder predictivo del modelo. Este parámetro debe ser mayor que 0.1 para un modelo significativo y mayor que 0.5 para un buen modelo, por lo tanto, solo el TBHQ y el BHA cumplen con lo anterior. La diferencia entre los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  debe ser menor que 0.3 para un buen modelo y al hacer la comparación en la gráfica, esta condición se cumple solo para el TBHQ y el BHA, por lo que, el modelo es bueno para ambos analitos. Respecto a la validación del modelo, al ser mayor que 0.25, no hay falta de ajuste del modelo. Esto quiere decir que el error del modelo está en el mismo rango que el error puro (variación de la respuesta en las mismas condiciones), ya que, cuando se tiene un valor inferior a 0.25 nos indica problemas de modelo estadísticamente significativos, como la presencia de valores atípicos, un modelo incorrecto o un problema de transformación. Por último, la reproducibilidad, la cual es la variación de la respuesta en las mismas condiciones (error puro) es mayor a 0.5. Por lo tanto, se puede decir que bajo las mismas condiciones la mayoría de los valores de la respuesta son idénticos. En general podemos decir que el modelo experimental es bueno para el TBHQ y BHA, sin embargo, para el BHT no tiene buen poder de predicción ni ajuste.

En los resultados obtenidos en las gráficas de coeficientes para el efecto estandarizado de los factores evaluados, se observó que para el TBHQ las variables del volumen de la fase extractante, proporción de agua, método de agitación, tiempo de agitación, tuvieron una influencia significativa para la extracción de dicho analito. Las interacciones entre variables que tuvieron

influencia significativa fueron el tipo de DES con la proporción de agua, el volumen de la fase extractante con el método de agitación, el volumen de la fase extractante con la proporción de agua, el volumen de la fase extractante con el tiempo de agitación y el tiempo de agitación con el método de agitación. Acerca del BHA, las variables con influencia significativa fueron el tipo de DES, volumen de la fase extractante, proporción de agua, método de agitación, tiempo de agitación y el tiempo de centrifugación. En cuanto a las interacciones entre las variables, las que tuvieron una influencia significativa, fueron el tipo de DES con la proporción de agua, el volumen de la fase extractante con el tiempo de agitación, el volumen de fase extractante con la proporción de agua, método de agitación con el tiempo de agitación y el tiempo de centrifugación con la proporción de agua. Por otro lado, para el BHT ninguna variable ni interacción entre variables tuvo una influencia significativa. El hecho de que ninguna variable posee influencia significativa en la extracción del BHT, se puede deber a las características fisicoquímicas de este compuesto, ya que este es el que tiene la polaridad más baja ( $\log P = 5.3$ ) de los compuestos analizados, además de que el grupo funcional que le confiere la poca polaridad (grupo hidroxilo) podría sufrir de impedimento estérico debido a los dos grupos *ter*-butilo que lo rodean (Vaz et al., 2023). Lo anterior contribuye directamente a las nulas o pocas interacciones formadas entre los DES hidrofílicos y este compuesto, lo cual se refleja en la baja capacidad de extracción de estos disolventes.

Una vez obtenida esta información se procedió a establecer como fijas las condiciones de las variables que no tuvieron influencia significativa en la respuesta, estas fueron la velocidad de centrifugación y la cantidad de muestra.

Las técnicas convencionales como la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida presentan la gran desventaja del uso de grandes cantidades de muestra. Para poder cumplir con los principios de la Química Verde, ha surgido la miniaturización de las técnicas de preparación de muestra, las cuales tienen como requisito el uso de bajas cantidades de muestra (Chormey & Bakırdere, 2018). Debido a esto se evaluó reducir la cantidad de la muestra para llevar a cabo de manera adecuada el proceso de extracción (Subramanian & Anandharamakrishnan, 2023). Para este caso en particular esta variable resultó no tener influencia significativa en la extracción, dentro de los niveles estudiados, debido probablemente a que la cantidad de compuestos extraídos dependen de su concentración en la matriz y no de la cantidad de muestra (Balasubramanian & Panigrahi, 2011). Por lo tanto, se estableció una cantidad de muestra de 0.2 g para cumplir con el requisito de la miniaturización de las técnicas de extracción además de disminuir la cantidad de residuos.

Con respecto a la centrifugación, este procedimiento es necesario para la separación de la fase extractante de la muestra. Aunque comúnmente de 2 a 10 min a una velocidad de alrededor de 2000 rpm es suficiente para una adecuada

separación, puede variar según cada caso. Sin embargo, a mayores velocidades de centrifugación se logra una mejor separación (Wenkui Li et al., 2019). Debido a que la velocidad no fue relevante para la extracción de los analitos, se decidió seleccionar el nivel más alto de 5000 rpm, para asegurar una separación adecuada de las fases.

Las variables que tuvieron influencia significativa en la respuesta se pueden clasificar en variables determinantes y variables cuantitativas. Las variables cuantitativas presentan como valor distintas opciones, mientras que, las variables determinantes, solo tienen como valor dos opciones, por lo que el modelo de tamizaje es suficiente para conocer cuál es la que mejora la respuesta. De acuerdo con los gráficos de coeficiente, las variables determinantes que tuvieron influencia significativa en la respuesta fueron el tipo de DES (tipo de fase extractante), la adición de agua en la fase extractante y el método de agitación.

El uso de los DES como fases extractantes para antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites comestibles ya ha sido reportado (W. Liu et al., 2017). Los DES probados en este proyecto de investigación estaban compuestos de cloruro de colina y glicerol en proporción molar 1:2, respectivamente y de cloruro de colina y urea en proporción molar 1:2, respectivamente. Al utilizar el DES de ChCl:Ur (1:2) como fase extractante se obtuvieron bajas respuestas en la extracción de todos los analitos, mientras que las mejores respuestas se obtuvieron con el DES de ChCl:Gly (1:2). Esto puede deberse a que el DES de

ChCl:Ur (1:2) es más polar que el DES de ChCl:Gly (1:2) (Jurić et al., 2021), lo cual genera escasas interacciones de este DES con estos compuestos relativamente no polares, mientras que al utilizar un DES con menor polaridad como el de ChCl:Gly (1:2) se favorecen las interacciones entre esta mezcla eutéctica y los analitos (Hansen et al., 2021). Esto corresponde con lo reportado anteriormente por W. Liu y colaboradores, quienes obtuvieron recuperaciones mayores a 90% de TBHQ utilizando el DES de ChCl:Gly (1:2) (W. Liu et al., 2022). Debido a lo anterior, se decidió descartar el DES compuesto por ChCl:Ur (1:2) como fase extractante para los futuros experimentos. y continuar el desarrollo experimental utilizando solo como fase extractante el DES ChCl:Gly (1:2).

Originalmente se decidió evaluar la adición de agua a distintas proporciones en los DES probados como fases extractantes, debido a que se ha reportado que el uso del agua tanto como componente de los DES como adicionada a los DES una vez formados, puede favorecer la extracción de compuestos que tienen un Log P semejante al de los analitos de este trabajo (Cao et al., 2022; Pradanas-González et al., 2023). Sin embargo, esto no concuerda con lo encontrado, ya que la adición de agua resultó ser no favorable para la extracción de TBHQ, BHT y BHA, puesto que las recuperaciones obtenidas de los tres compuestos fueron muy bajas. Por lo tanto, se descartó el uso de la adición de agua a la fase extractante.

Para llevar a cabo el proceso de transferencia de masa de la muestra a la fase extractante durante el proceso de extracción, se propusieron dos métodos de agitación, el uso de vórtex y el uso de ultrasonido. El uso del vórtex para la agitación produce una emulsificación suave, donde se forman finas gotas entre ambas fases lo que permite extraer rápidamente los analitos debido a que se acorta la distancia de difusión y el área de la interfase se hace más grande lo cual permite un mayor contacto entre fases (Bosch Ojeda & Sánchez Rojas, 2014). Esto lleva a que sea posible extraer los analitos más rápidamente, como ha sido demostrado en el reporte de Çabuk y colaboradores, quienes obtuvieron una recuperación de hasta 106% al extraer galatos de alquilo mediante una microextracción líquido-líquido basada de DES en aceites vegetales (Çabuk et al., 2019). Por otro lado, aunque el uso del ultrasonido puede llegar a ser eficiente, se necesita un tiempo de extracción más largo como lo reportan W. Liu y colaboradores, quienes utilizando 30 min lograron obtener recuperaciones mayores al 93% para el TBHQ, mediante una microextracción líquido-líquido en aceites de soja (W. Liu, Zong, et al., 2018). Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos que se llevaron a cabo, al utilizar el ultrasonido disminuyó drásticamente la respuesta de todos los analitos, mientras que el uso del vórtex aumento las respuestas. Esto concuerda con lo anteriormente descrito, por lo que se seleccionó la agitación con vórtex como el proceso óptimo para la extracción y se descartó la agitación con ultrasonido.

Aprovechando el poder de predicción del modelo matemático de los experimentos del tamizaje, se construyeron gráficos de contorno para las variables cuantitativas con influencia significativa en la extracción (el volumen de fase extractante, el tiempo de agitación y el tiempo de centrifugación). Estos indicaron que se maximiza la respuesta, tanto para el BHA como para el TBHQ, al utilizar un menor volumen de fase extractante y al utilizar un mayor tiempo de agitación y de centrifugación. En base a estos resultados y para poder llevar a cabo la optimización de estas variables, se decidió utilizar un diseño simplex de múltiple descarte utilizando los experimentos mostrados anteriormente en la Tabla VI. Como puede verse en la Figura 20, para el BHA y el BHT se obtuvieron respuestas muy bajas en todos los experimentos realizados, sin embargo, la recuperación para TBHQ siempre fue alta. La mayor respuesta del TBHQ se obtuvo al utilizar 50  $\mu$ L de fase extractante (ChCl:Gly, 1:2), 10 min de agitación en vórtex y una centrifugación a 5000 rpm durante 8 min, por lo que se decidió establecer estas condiciones como las óptimas del método de microextracción líquido-líquido.

Como se mencionó anteriormente, en ninguno de los experimentos del diseño simplex de múltiple descarte se obtuvo una recuperación adecuada para el BHA y el BHT, incluso su cuantificación no fue posible. Esto se debe a que las condiciones de extracción evaluadas no fueron adecuadas para estos analitos, a pesar de los esfuerzos realizados para aumentar la respuesta. Por lo tanto, el resto del trabajo se centrará en el estudio solo del TBHQ.

## **7.5 Evaluación del desempeño del método de extracción previamente optimizado y validado en muestras de aceite vegetal.**

A partir de este punto experimental se decidió trabajar únicamente con el TBHQ, por lo que se realizaron modificaciones al método cromatográfico previamente desarrollado (Tabla X) con la finalidad de reducir el tiempo de análisis. Las nuevas condiciones se muestran en la Tabla VII y es importante mencionar que con este nuevo método fue posible la separación adecuada de los tres analitos de forma simultánea (Figura 23), por lo que este método puede servir como una alternativa en la determinación cualitativa de ellos.

Para la validación el método propuesto se construyeron dos curvas de calibración para el TBHQ: una preparada en fase móvil, cuyos estándares no fueron sometidos a la extracción; y una en matriz blanco de aceite, cuyos estándares fueron sometidos a la extracción bajo las condiciones óptimas (Tablas XVI y XVIII).

En cuanto a la linealidad las dos curvas se construyeron en un rango de 1 a 300 mg/L por triplicado. Las curvas de calibración se evaluaron en base a una inspección visual de la curva de calibración obtenida; el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y de correlación ( $R$ ) obtenidos a partir del análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados; y el %DER de los factores de respuesta obtenidos en cada nivel de concentración de las curvas de calibración.

En cuanto a la inspección visual, se observó una tendencia lineal para las dos curvas de calibración (Figuras 22 y 25). Tanto los coeficientes de determinación como los de correlación fueron mayores a 0.99 y 0.995, respectivamente (Castro et al., 2020). Por último, los %DER de los factores de respuesta obtenidos fueron menores al 15% (Portillo et al., 2022). Debido a los resultados anteriores se considera que las dos curvas de calibración fueron lineales en el intervalo propuesto.

La precisión fue evaluada como el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de las respuestas obtenidas y de los tiempos de retención para el TBHQ. Para esto se tomaron en cuenta los criterios de aceptación para la validación de un método analítico establecidos en la AOAC, siendo el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) menor de un 5.3%. Como puede verse en la Tablas XVI y XVIII, tanto los valores de %DER de las respuestas y del  $t_R$  encontrados para el TBHQ fueron de menores al criterio de aceptación (5.3%), lo cual indica que los métodos son precisos.

La exactitud se evaluó mediante la correlación de la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real, obteniendo en todos los casos la ecuación de la recta resultante y haciendo la evaluación con el valor de la pendiente y el del coeficiente de determinación. Para todas las curvas de calibración evaluadas, el análisis de correlación arrojó valores de la

pendiente  $\approx 1$  con coeficientes de determinación mayor a 0.99, por lo tanto, los métodos son exactos.

Los límites de cuantificación y de detección fueron calculados en base a las ecuaciones 5 y 6. Respecto a la curva de calibración preparada en fase móvil, el límite de cuantificación fue de 0.045 mg/L mientras que el límite de detección obtenido fue de 0.013 mg/L. Anteriormente, Çabuk y colaboradores reportaron el uso de un proceso de microextracción líquido-líquido dispersiva a base de disolventes de baja densidad para la determinación de antioxidantes sintéticos en bebidas mediante CLAR con detector UV-Vis de longitud de onda variable. Los límites de detección y de cuantificación fueron obtenidos en base a la relación S/N siendo esta 3 veces y 10 veces la relación respectivamente. Los resultados obtenidos de los límites de detección y de cuantificación para el TBHQ fueron de 0.85 y 2.82 ng/mL respectivamente (Çabuk & Köktürk, 2013). Además, Cao y colaboradores reportan el uso de método de microextracción líquido-líquido basado en DES para TBHQ y BHA en aceite comestibles con un análisis mediante CLAR con detector UV-Vis de longitud de onda variable. (Cao et al., 2024). Los límites de detección y de cuantificación fueron obtenidos en base a la relación S/N siendo esta 3 veces y 10 veces la relación respectivamente. Los resultados obtenidos de los límites de detección y cuantificación para el TBHQ fueron 0.7 y 2.3  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. (Cao et al., 2024). Aunque tanto de límites de detección como de cuantificación encontrados en el método cromatográfico desarrollado y validado en este trabajo son relativamente elevados, pueden

considerarse adecuados teniendo en cuenta que se están comparando los límites de detección y/o cuantificación del método, y los que se obtuvieron en esta parte experimental son los límites instrumentales ya que los estándares de la curva de calibración preparada en fase móvil no fueron sometidos al protocolo de extracción.

Al comparar las curvas de calibración en fase móvil y en matriz después de la extracción (Figura 27), se puede observar que la respuesta del TBHQ aumenta en la curva preparada en matriz extraída con respecto a la curva preparada en fase móvil sin extracción. Este efecto puede ser debido, por una parte, por un efecto propiamente de la matriz, ya que, dependiendo de la complejidad de las matrices, puede presentarse el llamado efecto matriz. Este se define como el cambio en una señal analítica (aumento o disminución), provocado por los componentes de una muestra excepto el analito (Harris, 2003). Además, este influye drásticamente en el desempeño de los métodos analíticos tanto para la identificación como para la cuantificación de un analito (Zhou et al., 2017). Por otra parte, el aumento de la respuesta de la curva de TBHQ podría ser por la preconcentración, debido a que durante el proceso de extracción la concentración del analito puede ser mayor en la fase extractante, al utilizar un volumen bajo, a comparación de la concentración inicial del analito en la matriz (Zang et al., 2009).

Con el fin de evaluar el origen del aumento de las respuestas, se decidió evaluar el efecto matriz y calcular el factor de preconcentración.

El efecto de matriz se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración de estándar externo a los mismos niveles de concentración que las curvas construidas en fase móvil y en matriz. La curva construida en hexano se sometió al proceso de extracción bajo las condiciones óptimas.

Dicha curva de calibración se validó tomando en cuenta los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación (Tabla XVII).

En cuanto a la linealidad la curva se construyó preparando estándares un rango de 1 a 300 mg/L por triplicado. La evaluación de este parámetro fue en base a una inspección visual de la curva de calibración obtenida; el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y de correlación ( $R$ ) obtenidos a partir del análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados; y el %DER de los factores de respuesta obtenidos en cada nivel de concentración de las curvas de calibración. En cuanto a la inspección visual, se observó una tendencia lineal para la curva de calibración (Figura 24). Tanto los coeficientes de determinación como los de correlación fueron mayores a 0.99 y 0.995, respectivamente (Castro et al., 2020). Por último, los %DER de los factores de respuesta obtenidos fueron menores al 15% (Portillo et al., 2022). Debido a los resultados anteriores se considera que la curva de calibración fue lineal en el intervalo propuesto.

La precisión fue evaluada como el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de las respuestas obtenidas y de los tiempos de retención para el TBHQ. Para esto se tomaron en cuenta los criterios de aceptación para la validación de un método analítico establecidos en la AOAC, siendo el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) menor de un 5.3%. Como puede verse en la Tabla XVII, tanto los valores de %DER de las respuestas y del  $t_R$  encontrados para el TBHQ fueron de menores al criterio de aceptación (5.3%), lo cual indica que el método es preciso.

La exactitud se evaluó mediante la correlación de la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real, obteniendo en todos los casos la ecuación de la recta resultante y haciendo la evaluación con el valor de la pendiente y el del coeficiente de determinación. Para todas las curvas de calibración evaluadas, el análisis de correlación arrojó valores de la pendiente  $\approx 1$  con coeficientes de determinación mayor a 0.99, por lo tanto, el método es exacto.

Los límites de cuantificación y de detección fueron calculados en base a las ecuaciones 5 y 6. El límite de cuantificación fue de 0.124 mg/L mientras que el límite de detección obtenido fue de 0.037 mg/L. W. Liu y colaboradores reportaron el desarrollo y validación de un método para determinar TBHQ en aceites comestibles mediante microextracción líquido-líquido basada e DES con su posterior análisis mediante CLAR con detector UV-Vis de longitud de onda variable. En este reporte se obtuvieron límites de detección y de cuantificación

en base a la relación S/N siendo esta 3 y 10 veces esta relación para el límite de detección y cuantificación respectivamente. El límite de detección fue de 0.02 mg/kg, mientras que el límite de cuantificación fue de 0.06 mg/kg (W. Liu et al., 2018). Aunque tanto de límites de detección como de cuantificación encontrados en el método cromatográfico desarrollado y validado en este trabajo son relativamente elevados, pueden considerarse adecuados teniendo en cuenta que se están comparando los límites de detección y cuantificación calculados a partir de un método distinto al empleado, además de que los resultados obtenidos son concentraciones menores a las del rango lineal empleado.

En un primer enfoque para evaluar el efecto de matriz, se comparó la pendiente de la curva de calibración preparada en hexano y la pendiente de la curva de calibración en matriz, de acuerdo con reportes de la bibliografía (Altunay et al., 2018; Buppasang et al., 2022; Cao et al., 2024), mediante una prueba  $t$  ( $\alpha=0.05$ ) (Aguilar et al., 2020)

El otro enfoque fue mediante una ecuación para calcular el porcentaje de efecto matriz de acuerdo con la metodología reportada por Buppasang y colaboradores (Buppasang et al., 2022).

En base a los resultados, mostrados en la Tabla XIX, podemos decir que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes de las curvas

evaluadas, debido a que la  $t$  crítica fue mayor a la  $t$  calculada (Miller & Miller, 2002). En cuanto al cálculo realizado para determinar el efecto matriz se encontró un valor de 97.706 %. Esto confirma que no hubo efecto de matriz, ya que los autores establecen que si el valor encontrado está dentro de un rango de 80 a 120% no se presenta efecto matriz en el método desarrollado (Buppasang et al., 2022; Santaladchaiyakit et al., 2022).

Una vez descartado el efecto matriz se determinó el factor de enriquecimiento como una medida de la preconcentración de acuerdo con la metodología reportada por Karami y Shokrollahi (Karami & Shokrollahi, 2023). En este cálculo se obtuvo un resultado de 2.03, lo cual nos indica que se logró preconcentrar el TBHQ. Por lo tanto, podemos decir que el aumento en la respuesta del TBHQ en la curva de calibración preparada en matriz se debe a un efecto de preconcentración debido al proceso de extracción.

Se evaluó el desempeño del método en términos de precisión y exactitud en muestras de aceite vegetal comestible. Para llevar a cabo esta evaluación, se prepararon muestras de aceite vegetal comestible (libres de antioxidantes fenólicos sintéticos) enriquecidas a tres niveles de concentración (10, 100 y 200 mg/L) en base al rango lineal del método empleado.

En la Tabla XXIV, se presentan los resultados correspondientes al desempeño analítico, así como las condiciones de extracción empleadas en otros métodos reportados en literatura para la extracción de TBHQ en aceite vegetal comestible.

Se evaluó la precisión (intradía e interdía), mediante el cálculo del %DER de la concentración y de los  $t_R$  (Tabla XX). Para ambos casos, en la precisión intradía, se obtuvieron resultados menores a 5.3% (AOAC, 2016), y en el caso de la precisión interdía, se obtuvieron resultados menores a 8% (AOAC, 2016). Por lo anterior, se puede mencionar que el método de extracción desarrollado es preciso, ya que los resultados encontrados están dentro de lo recomendado por la AOAC. Anteriormente Mogaddam y colaboradores reportaron el desarrollo y validación de un método para determinar tres antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites comestibles mediante microextracción líquido-líquido dispersiva con su posterior análisis mediante CG con detección de ionización de llama. En este reporte se obtuvo una precisión intradía e interdía menor 5.4% y menor a 7.4 respectivamente (Mogaddam et al., 2021), el cual es mayor al obtenido en el método de extracción propuesto. Por otra parte, Cao y colaboradores reportan resultados de %DER menores al 5% para un método de microextracción líquido-líquido basado en DES para TBHQ y BHA en aceite comestibles (Cao et al., 2024). Estos resultados son mayores a los obtenidos en el método propuesto. Además, el método establecido por la AOAC para determinar antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites vegetales comestibles mostró %DER

relativamente altos a comparación con lo obtenido en este trabajo, siendo estos para la precisión intradía menores a 7.85% y para la precisión interdía menores a 21.5% (AOAC, 1995).

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación en los mismos niveles de concentración y en los mismos días que la precisión. En base a los resultados obtenidos, se considera que el método de extracción desarrollado es exacto, ya que los resultados de recuperación encontrados en los tres niveles de concentración se encontraron en un rango de 90 – 107 %. Lo cual está dentro de lo recomendado por la AOAC (AOAC, 2016). Mogaddam y colaboradores reportaron el desarrollo y validación de un método para determinar tres antioxidantes fenólicos sintéticos en aceites comestibles mediante microextracción líquido-líquido dispersiva con su posterior análisis mediante CG con detección de ionización de llama. En este reporte se obtuvo una recuperación de 86% (Mogaddam et al., 2021), el cual es menor al obtenido en el método de extracción propuesto.

**Tabla XXIV.** Comparación del método propuesto con otros métodos.

<i>Fase extractante</i>	<i>Cantidad de muestra</i>	<i>Método de agitación</i>	<i>Tiempo de extracción</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Centrifugación</i>	<i>FE<sup>1</sup></i>	<i>%R<sup>2</sup></i>	<i>Precisión (%DER)</i>	<i>LD y LC</i>	<i>Referencia</i>
50 µL ChCl:Gly (1:2)	0.2 g	Vórtex	10 min	Ambiente	8 min, 5000 rpm	2.03	88.810-107.832	Intradía: <2.014 Interdía: <4.585	0.040 y 0.134 mg/L 0.034 y 0.114 mg/kg	<b>Método propuesto</b>
50 mL Acetonitrilo (x3) = 150 mL	5.5 g	Manual	NR	Ambiente	NR	NR	97.5-103	Intradía: <7.85 Interdía: <21.5	NR	AOAC (1995)
400 µL ChCl:EthyGly (1:2)	0.15 g + 3 mL hexano	Baño de ultrasonido	30 min	50 °C	10 min, 3000 rpm	NR	98.5-112	Intradía: 1.1 Interdía: 3.2	0.02 y 0.06 µg/L	W. Liu et al. (2017)
400 µL ChCl:Ses(1:2)	0.2 g	Baño de ultrasonido	30 min	70 °C	10 min, 3000 rpm	NR	93.4-108.8	Intradía: 1.5 Interdía: 2.2	0.02 y 0.06 µg/L	W. Liu, Zong, et al. (2018)
600 µL ChCl:Ác Asc(2:1) con 10 % H <sub>2</sub> O	0.1 g + 3 mL hexano	Baño de ultrasonido	30 min	60 °C	10 min, 3000 rpm	NR	96.1-109	Intradía: 1.8 Interdía: 2.9	0.02 y 0.06 mg/kg	W. Liu, Zhang, et al. (2018)
90 µL TBAC-hidroquinona	5 mL	NR	NR	NR	5 min, 4000 rpm	430	86	Intradía: <5.4 Interdía: <7.4	0.13 y 0.36 ng/mL	Mogaddam et al. (2021)
400 µL ChCl: EthyGly(1:2)	0.1 g	Vórtex	5 min	Ambiente	2 min, 5000 rpm	NR	96.1–106.0%	Intradía: <2 Interdía: <2	0.02 mg/kg	W. Liu et al. (2022)
TBAC (167.2 mg) y AA (68.8 µL) *In situ (62 °C; 5 min)	5 mL	Vórtex	2.2 min	Ambiente	2 min, 5000 rpm	22	89.2-103.6	<5	0.7 y 2.3 µg/L	Cao et al. (2024)

<sup>1</sup>%R: %Recuperación

<sup>2</sup>FE: Factor de enriquecimiento

NR: No reporta

Por otro lado, los límites de detección y cuantificación del método desarrollado fueron mayores en comparación con los métodos que se muestran en la Tabla XXIV. Por ejemplo, W. Liu y colaboradores reportaron el desarrollo y validación de un método para determinar TBHQ en aceites comestibles mediante microextracción líquido-líquido basada en DES con su posterior análisis mediante CLAR con detector UV-Vis de longitud de onda variable. En este reporte se obtuvieron límites de detección y de cuantificación en base a la relación S/N siendo 3 y 10 veces esta relación para el límite de detección y cuantificación, respectivamente. El límite de detección fue de 0.02 mg/kg, mientras que el límite de cuantificación fue de 0.06 mg/kg (W. Liu, Zhang, et al., 2018). Además, Cao y colaboradores reportan el uso de un método de microextracción líquido-líquido basado en DES para TBHQ y BHA en aceite comestibles con un análisis mediante CLAR con detector UV-Vis de longitud de onda variable. (Cao et al., 2024). Los límites de detección y de cuantificación fueron obtenidos en base a la relación S/N siendo 3 veces y 10 veces la relación, respectivamente. Los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación para el TBHQ fueron 0.7 y 2.3  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. (Cao et al., 2024). Los resultados obtenidos en el método de extracción propuesto son mayores, ya que estos fueron 0.040 y 0.134 mg/L para el límite de detección y cuantificación, respectivamente. Se debe de considerar que estos parámetros fueron calculados con las ecuaciones 5 y 6, lo cual puede genera diferencias al comparar los resultados obtenidos con otro método, como lo es la relación S/N. A pesar de que los resultados del método de extracción propuesto fueron relativamente altos, se consideran adecuados para el método desarrollado debido a que son

concentraciones menores a las del rango lineal empleado y, además, se logra concentrar el TBHQ en la muestra, lo que permite cuantificarlo en muestras de aceite vegetal comestible con concentraciones relativamente bajas de este antioxidante.

En cuanto al factor de enriquecimiento, se obtuvo un resultado de 2.03 lo cual se considera como una ventaja destacable el método ya que esto nos indica que el método desarrollado tiene una alta eficiencia de extracción a comparación de los métodos de extracción reportados por la AOAC, W. Liu y colaboradores, quienes no logran preconcentrar al TBHQ en la fase extractante (AOAC, 1995; W. Liu et al., 2017, 2022; W. Liu, Zhang, et al., 2018; W. Liu, Zong, et al., 2018). Esto se debe principalmente a la alta afinidad del DES de ChCl:Gly (1:2) con el TBHQ, lo cual contribuye a aumentar la capacidad de extracción de dicho compuesto, que al utilizar un volumen bajo de esta fase extractante en relación con la muestra, aumenta su concentración (Müller et al., 2003; Zang et al., 2009).

## **7.6 Evaluación ecológica del método de extracción previamente optimizado y validado en muestras de aceite vegetal.**

La evaluación ecológica de los métodos analíticos es un parámetro que se considera necesario en la actualidad, ya que, con la introducción de la Química Verde, se busca tener un compromiso entre los procedimientos analíticos y el medio ambiente (Lenoir et al., 2020).

Para evaluar el grado ecológico de un método, se utilizan diversas herramientas que permiten establecer cualitativa y/o cuantitativamente el grado ecológico de los métodos analíticos, en este trabajo se incluyeron tres escalas, las cuales fueron *Analytical Eco-Scale*, *Analytical Procedure Inde* y *Analytical GREENness metric* (Płotka-Wasyłka, 2018).

La primera escala fue la *Analytical Eco-Scale*, la cual es una herramienta que genera un valor numérico final tomando en cuenta puntos de penalización asignados en base al impacto ambiental que tiene cada paso del método analítico. Un análisis ecológico ideal se obtiene cuando este tiene un valor de 100, mientras que es excelente si es mayor a 75, aceptable si es mayor a 50 e inadecuado si es menor a 50. La ventaja principal de esta escala es la simplicidad para su uso, además de que señala el impacto ambiental de los métodos analíticos en diferentes aspectos mediante la puntuación asignada. Los aspectos considerados para esta evaluación son la toxicidad de los reactivos, los instrumentos empleados, el riesgo laboral y la cantidad de residuos producidos (Tobiszewski et al., 2015).

La segunda escala ecológica empleada fue *Green Analytical Procedure Index* (GAPI, por sus siglas en inglés), la cual realiza la evaluación de un método analítico desde la recolección de muestras hasta la determinación final. En ella se incluyen 26 parámetros que evalúan la preparación de la muestra, los reactivos e instrumentos empleados, la colección y preservación de la muestra y la síntesis de reactivos. A cada parámetro se le asigna un color indicando el impacto ambiental en tres niveles de bajo a alto: verde, amarillo o rojo, respectivamente (Płotka-Wasyłka & Wojnowski, 2021). Con esta escala se obtiene de forma gráfica la evaluación ecológica del método, lo cual hace que la identificación del método más ecológico para un análisis específico sea sencilla y rápida.

La tercera y última escala utilizada fue *Analytical GREENness metric* (AGREE, por sus siglas en inglés), la cual toma en consideración los doce principios de la GAC (Figura 4) y se tiene una escala de 0 a 1 punto, siendo 1 el máximo rendimiento ecológico posible a alcanzar (Vieira-Sellai et al., 2022). Esta escala toma en cuenta todo el procedimiento analítico, además proporciona información más enfocada a los principios más fuertes y débiles de la GAC. Al igual que con la escala GAPI se logra identificar de manera gráfica el impacto ambiental generado para cada método evaluado considerando cada principio de la GAC.

El método desarrollado en este trabajo presenta ventajas ecológicas frente a otros métodos reportados. Principalmente debido al bajo volumen de fase extractante empleado (50  $\mu$ L) frente a cantidades más altas de incluso 150 mL

utilizados en el método de la AOAC (1995). Además de la menor cantidad de muestra empleado en comparación con los 5 mL utilizados en el reporte de Cao y colaboradores (Cao et al., 2024). Incluso en otros reportes se llega a utilizar 3 mL de hexano con el fin de diluir la muestra, lo cual aumenta su volumen hasta 3.15 mL (W. Liu et al., 2017; W. Liu, Zhang, et al., 2018). Por último, se ha reportado en otros métodos el uso de temperaturas relativamente altas para llevar a cabo de manera satisfactoria la extracción de TBHQ (W. Liu et al., 2017; W. Liu, Zhang, et al., 2018; W. Liu, Zong, et al., 2018), lo cual implica un mayor consumo de energía eléctrica, algo que en el método propuesto no se emplea.

En general, al comparar el método desarrollado con otros métodos para la determinación de TBHQ en aceite vegetal comestible, se observó un mayor rendimiento ecológico del método propuesto como puede verse en la Tabla XXII. Las estas ventajas ecológicas que presenta el método desarrollado se ven reflejadas en la evaluación ecológica realizada con las escalas seleccionadas, las cuales fueron empleadas para poder llevar a cabo una evaluación y estimación certera de la influencia ambiental del método desarrollado. Aunque el método propuesto no logro ser un método ecológico ideal, debido al proceso de extracción, al uso de disolventes orgánicos en la fase móvil y el uso de CLAR para el análisis del TBHQ, se realizó un esfuerzo para cumplir con los principios de la Química Verde y así, tener un método lo más ecológico posible.

El valor encontrado con la escala Analytical Eco-Scale del método propuesto fue de 86. Tomando en cuenta que es mayor a 75, se considera un excelente análisis ecológico. Los puntos de penalización obtenidos fueron por el

uso de etanol y ácido acético; el consumo energético proveniente del uso de equipos como el cromatógrafo de líquidos, sonicador y centrifuga; y la generación de residuos en un rango de 1 a 10 mL. En otros métodos analíticos reportados para la extracción de TBHQ en aceite vegetal comestible se emplearon reactivos con mayor grado de toxicidad como el metanol, hexano, propanol y acetonitrilo. Además de que la emisión de vapores provenientes de estos disolventes provoca un riesgo laboral; y un aumento en el volumen de residuos generados. A su vez estos métodos no emplean ningún tratamiento para los residuos, lo cual influye gravemente en el impacto ambiental (AOAC, 1995; Cao et al., 2024; W. Liu et al., 2017, 2022; W. Liu, Zhang, et al., 2018; W. Liu, Zong, et al., 2018). Para estos métodos se obtuvieron resultados de la escala Analytical Eco scale desde 67 hasta 83, los cuales son inferiores a los 86 puntos obtenidos para el método desarrollado en este trabajo. Solo el reporte presentado por Mogaddam y colaboradores logro obtener una mayor puntuación (90) a la del método propuesto (Afshar Mogaddam et al., 2021), sin embargo, al comparar los resultados de las escalas AGREE y GAPI de este método observamos que el método propuesto posee un mayor rendimiento ecológico.

En el caso de la escala AGREE, el método desarrollado obtuvo un valor de 0.61, con solamente tres principios asignados con tonalidades naranjas, lo cual nos indica un mayor impacto ambiental (son preferibles las mediciones *in situ*, los métodos de múltiples analitos son preferibles y los reactivos tóxicos deben eliminarse); y dos en tonalidades amarillas, lo cual nos indica un impacto ambiental moderado (aplicar técnicas analíticas directas y evitar generar

volúmenes grandes de desecho). Al comparar la evaluación de otros métodos mediante esta escala observamos puntuaciones menores, desde 0.31 hasta 0.58, y con un mayor número de principios asignados en tonalidades amarillas y rojas. Esto nos indica que los otros métodos de extracción para TBHQ en aceite vegetal comestible cumplen con un menor número de los principios de la Química Analítica Verde, principalmente los que consideran el uso de un menor volumen de reactivos, con menor grado de toxicidad y un menor volumen de residuos (Afshar Mogaddam et al., 2021; AOAC, 1995; Cao et al., 2024; W. Liu et al., 2022; W. Liu, Zhang, et al., 2018).

Por último, con el pictograma obtenido de la escala GAPI, se confirmó que el método desarrollado tiene un mayor rendimiento ecológico, ya que hace uso de una menor cantidad de reactivos con un menor grado de toxicidad, una disminución en la generación de residuos, menor energía eléctrica empleada y el uso de un diseño de experimentos para la optimización de la etapa de extracción. Todo lo anterior se ve reflejado al solo tener solo 6 secciones en color amarillo, indicando un impacto ambiental medio, y solo 2 secciones en color rojo indicando un mayor impacto ambiental. Al comparar este resultado con otros los de los otros métodos en donde se obtienen hasta 10 secciones en color rojo para el método de la AOAC (AOAC, 1995) y hasta 7 secciones en color amarillo para los métodos de W. Liu y colaboradores y el de Afshar y colaboradores (W. Liu, Zhang, et al., 2018; Afshar Mogaddam et al., 2021), podemos decir que el método propuesto en este trabajo se tiene un mejor desempeño ecológico en base a esta escala.

Con los resultados obtenidos de las escalas ecológicas en conjunto, se puede decir que el método desarrollado es una alternativa potencialmente ecológica con alta eficiencia de extracción para TBHQ en aceites vegetales comestibles.

## 7.7 Aplicación del método de extracción propuesto.

El método de extracción desarrollado se aplicó al análisis de muestras reales de aceite vegetal comestible.

De acuerdo con los datos que se presentan en la Tabla XXIII, para las tres muestras analizadas los resultados obtenidos fueron semejantes a lo reportado en las etiquetas de los productos.

El aceite de marca Mazola y el de la marca Vita Premium, reportaban contener 0.01 % de TBHQ y para ambos se obtuvieron resultados de 0.014 %, probablemente debido a los productores de dichos aceites están agregando una mayor cantidad de este antioxidante de lo reportado en la etiqueta. Mientras que la muestra de aceite marca Kartamus, reporta contener menos de 0.02 % de TBHQ y se encontró que presenta un 0.003 %, lo cual está dentro de lo reportado en la etiqueta. El análisis realizado indica que para los tres aceites comerciales se cumple con los límites permitidos para el TBHQ por la norma NMX-F-808-SCFI-2018 (0.02 %).

Por otro lado, al revisar los cromatogramas de estas tres muestras (Figura 28), se encontró una señal cromatográfica en el tiempo de retención que presentó el BHA, por lo que podría tratarse de este antioxidante. Sin embargo, no podemos reportar este resultado, puesto que la validación no se realizó para este compuesto.

Para poder confirmar la presencia de los compuestos diana, podrían llevarse a cabo algunas estrategias para llegar a su identificación, por ejemplo,

acoplar la CLAR a espectrometría de masas como técnica de análisis o hacer uso del método de adición estándar (Lehotay et al., 2008; Stachniuk & Fornal, 2016).

Es probable que los productores de estos aceites no reporten el total de los aditivos adicionados o las concentraciones reales adicionadas en este producto alimenticio, por lo que esto puede ser la causa de las diferencias encontradas entre los resultados y las etiquetas de los productos. De ser así no se estaría cumpliendo con lo establecido por la norma NOM-051-SCFI/SSA1-2010 y habría que verificar que se cumple con los límites permitidos para este otro antioxidante fenólico sintético. Debido a lo anterior, resulta interesante e importante realizar un monitoreo de otros aceites comerciales e implementar estrategias para confirmar la presencia y la concentración de los antioxidantes.

## **CAPÍTULO 8**

### **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

#### **8.1 Conclusiones.**

Se sintetizaron dos DES hidrofílicos a base de cloruro de colina, urea y glicerol. Se establecieron las condiciones óptimas que permiten la extracción y

preconcentración del TBHQ en aceite vegetal comestible utilizando una LLME basada en DES. El DES formado de cloruro de colina y glicerol (1:2), resultó ser el más adecuado para la extracción de TBHQ. La adición de agua a los DES no favoreció la extracción de ninguno de los analitos. Las condiciones experimentales probadas no fueron favorables para lograr la extracción de BHA y BHT. El método desarrollado resultó ser lineal, preciso y exacto con límites de detección para el TBHQ de 0.040 mg/L y 0.034 mg/kg, y límites de cuantificación para el TBHQ de 0.134 mg/L y 0.114 mg/kg. El método desarrollado podrá ser aplicado en el análisis de muestras comerciales ya que representa una potencial alternativa para monitoreo y control de calidad de TBHQ en aceites comestibles.

## **8.2 Perspectivas.**

1. Explorar el uso de otros DES para la extracción de BHA y BHT.
2. Evaluar otras condiciones para la extracción de BHA y BHT.
3. Analizar otras muestras de aceite vegetal comestible.

## BIBLIOGRAFÍA

Afshar Mogaddam, M. R., Farajzadeh, M. A., Tuzen, M., Jouyban, A., & Khandaghi, J. (2021). Organic solvent-free elevated temperature liquid–liquid extraction combined with a new switchable deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction of three phenolic antioxidants from oil samples. *Microchemical Journal*, *168*, 106433. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106433>

Aguilar Arteaga, K., Hernández Mera, C., Díaz Batalla, L., Castañeda Ovando, A., Cruz Pérez, A. E., Barrado Esteban, E., & Carrillo Cárdenas, M. (2020). Development of a dispersive liquid-liquid microextraction coupled with magnetic dispersive microsolid phase extraction for determination of triazines in wastewater samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *412*(5), 1203–1213. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02354-4>

Ahmadi-Jouibari, T., Aghaei, A., Sharafi, K., & Fattahi, N. (2020). Homogeneous liquid–liquid microextraction based on liquid nitrogen-induced phase separation followed by GFAAS for sensitive extraction and determination of lead in lead-adulterated opium and refined opium. *RSC Advances*, *10*(49), 29460–29468. <https://doi.org/10.1039/D0RA05304J>

Alison K. Bauer, L. D. D.-N. (2001). BUTYLATED HYDROXYTOLUENE (BHT) INDUCTION OF PULMONARY INFLAMMATION: A Role in Tumor Promotion.

*Experimental Lung Research*, 27(3), 197–216.  
<https://doi.org/10.1080/01902140120756>

Altunay, N., Ülüzger, D., & Gürkan, R. (2018). Simple and fast spectrophotometric determination of low levels of thiabendazole residues in fruit and vegetables after pre-concentration with ionic liquid phase microextraction. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(6), 1139–1154.  
<https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1444284>

Anastas, P. T. (1999). Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 167–175.  
<https://doi.org/10.1080/10408349891199356>

AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (16th ed.).

Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2008). Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 497–511.

Assadi, Y., Farajzadeh, M. A., & Bidari, A. (2012). Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists* (pp. 181–212). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00051-X>

Assassi, A. L., Roy, C.-E., Perovitch, P., Auzerie, J., Hamon, T., & Gaudin, K. (2015). Green analytical method development for statin analysis. *Journal of Chromatography A*, 1380, 104–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.066>

- Australian Government (2022). *Butylated hydroxyanisole and related antioxidants*.  
[https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/2022-01/EVA00029 - Evaluation statement - 14 January 2022 %5B2006 KB%5D.pdf%0A](https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/2022-01/EVA00029_Evaluation_statement_-_14_January_2022_2006_KB.pdf)
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (E. Quintanar Duarte, Ed.; 4ta ed.). Pearson Educación.
- Balasubramanian, S., & Panigrahi, S. (2011). Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0299-3>
- Bera, D., Lahiri, D., & Nag, A. (2006). Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 752–767. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.042>
- Berdahl, D. R., Nahas, R. I., & Barren, J. P. (2010). Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications: Understanding Mechanisms of Oxidation and Antioxidant Activity*, 272–320. <https://doi.org/10.1533/9780857090447.2.272>
- Bitas, D., & Samanidou, V. (2019). Biomedical applications. *Liquid-Phase Extraction*, 683–723. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00023-2>
- Bosch Ojeda, C., & Sánchez Rojas, F. (2014). Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction (VALLME): Applications. *Chromatographia*, 77(11–12), 745–754. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2669-x>

- Buppasang, R., Palasak, J., Kachangoon, R., Ponhong, K., Teshima, N., Burakham, R., Srijaranai, S., & Vichapong, J. (2022). Simultaneous Preconcentration of Triazole Fungicide Residues Using In-Situ Coacervative Extraction Based on a Double-Solvent Supramolecular System Prior to High Performance Liquid Chromatographic Analysis. *Molecules*, 27(19), 6273. <https://doi.org/10.3390/molecules27196273>
- Burke, S. (2001). *Regression and Calibration* (LC GC Europe Online Supplement, Ed.).
- Çabuk, H., & Köktürk, M. (2013). Low Density Solvent-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Synthetic Antioxidants in Beverages by High-Performance Liquid Chromatography. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/414398>
- Çabuk, H., Yılmaz, Y., & Yıldız, E. (2019). Vortex-Assisted Deep Eutectic Solvent-Based Liquid-Liquid Microextraction for the Analysis of Alkyl Gallates in Vegetable Oils. *Acta Chimica Slovenica*, 66(2), 385–394. <https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4877>
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Carabetta, S., Di Sanzo, R., Russo, M., & Rastrelli, L. (2014). Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1334. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.081>

- Cantwell, F. F., & Losier, M. (2002). Chapter 11 Liquid—liquid extraction. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 37, pp. 297–340). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(02\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(02)80048-4)
- Cao, J., Shi, Z., Wu, X., Hu, K., Zeng, B., & Zhao, F. (2024). In situ formation of a deep eutectic solvent for liquid-liquid microextraction of synthetic phenolic antioxidants in edible oil. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 39, 101568. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101568>
- Cao, J., Wang, C., Shi, L., Cheng, Y., Hu, H., Zeng, B., & Zhao, F. (2022). Water based-deep eutectic solvent for ultrasound-assisted liquid–liquid microextraction of parabens in edible oil. *Food Chemistry*, 383, 132586. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132586>
- Carbajal-Sánchez, J. A., Ramírez-Durán, N., Gamboa-Angulo, M., & Moreno-Pérez, P. A. (2021). Estado de la información del consumo en México de antioxidantes sintéticos en alimentos ultra-procesados, basados en los productos de la canasta básica. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*. <https://doi.org/10.24836/es.v31i58.1143>
- Castro Ríos, R., Melchor Martínez, E. M., Solís Cruz, G. Y., Rivas Galindo, V. M., Silva Mares, D. A., & Cavazos Rocha, N. C. (2020). HPLC Method Validation for *Jatropha dioica* Extracts Analysis. *Journal of Chromatographic Science*, 58(5), 445–453. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa004>

- Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., & Qiu, C. (2008). Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1184((1-2)), 191–219. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.026>
- Cheung, S. C. M., Szeto, Y. T., & Benzie, I. F. (2007). Antioxidant Protection of Edible Oils. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 39–42. <https://doi.org/10.1007/s11130-006-0040-6>
- Chormey, D. S., & Bakirdere, S. (2018). *Principles and Recent Advancements in Microextraction Techniques* (pp. 257–294). <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.03.011>
- Codex Alimentarius. (1995). *Codex general standards for food additives Codex STAN 192-1995*. [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.fao.org/gsfonline/docs/CXS\\_192e.pdf](https://www.fao.org/gsfonline/docs/CXS_192e.pdf)
- Delgado-Zamarreño, M. M., González-Maza, I., Sánchez-Pérez, A., & Carabias Martínez, R. (2007). Analysis of synthetic phenolic antioxidants in edible oils by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 100(4), 1722–1727. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.10.018>
- Dheyab, A. S., Abu Bakar, M. F., AlOmar, M., Sabran, S. F., Muhamad Hanafi, A. F., & Mohamad, A. (2021). Deep Eutectic Solvents (DESs) as Green Extraction Media of Beneficial Bioactive Phytochemicals. *Separations*, 8(10), 176. <https://doi.org/10.3390/separations8100176>

Duan, X., Liu, X., Dong, Y., Yang, J., Zhang, J., He, S., Yang, F., Wang, Z., & Dong, Y. (2020). A Green HPLC Method for Determination of Nine Sulfonamides in Milk and Beef, and Its Greenness Assessment with Analytical Eco-Scale and Greenness Profile. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 103(4), 1181–1189. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa006>

Drug Bank (2022). *t-Butylhydroquinone*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB07726.%0A>

El Achkar, T., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 3397–3408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>

Esfahani, H. S., Khoshsima, A., & Pazuki, G. (2020). Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractant for the efficient extraction of 1-butanol or 2-butanol from azeotropic n-heptane + butanol mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 313, 113524. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113524>

Eurachem. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf)

Felter, S. P., Zhang, X., & Thompson, C. (2021). Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 121, 104887. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104887>

- Gabriele, F., Chiarini, M., Germani, R., Tiecco, M., & Spreti, N. (2019). Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 291, 111301. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111301>
- Gałaszka, A., Migaszewski, Z. M., Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 61–72. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2012.03.013>
- Guimarães, J., Trindade Cursino, A., Ketzer Saul, C., Sierrakowski, M., Ramos, L., & Satyanarayana, K. (2016). Evaluation of Castor Oil Cake Starch and Recovered Glycerol and Development of “Green” Composites Based on Those with Plant Fibers. *Materials*, 9(2), 76. <https://doi.org/10.3390/ma9020076>
- Gunstone, F. D. (2013). Composition and Properties of Edible Oils. In W. Hamm, R. J. Hamilton, & G. Calliau (Eds.), *Edible oil processing* (Second, pp. 3–5). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118535202.ch1>
- Guo, L., Xie, M. Y., Yan, A. P., Wan, Y. Q., & Wu, Y. M. (2006). Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(6), 1881–1887. <https://doi.org/10.1007/S00216-006-0738-1/TABLES/5>
- Hammond, O. S., Bowron, D. T., Edler, K. J., Hammond, S., Edler, K. J., & Bowron, D. T. (2017). The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angewandte Chemie*, 129(33), 9914–9917. <https://doi.org/10.1002/ANGE.201702486>

Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B. W., Gurkan, B., Maginn, E. J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T. A., Baker, G. A., Tuckerman, M. E., Savinell, R. F., & Sangoro, J. R. (2021). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>

Harris, D. C. (2003). *Análisis químico cuantitativo* (Reverté, Ed.; 3era edición).

Huang, J., Guo, X., Xu, T., Fan, L., Zhou, X., & Wu, S. (2019). Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products. *Journal of Chromatography A*, 1598, 1–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.046>

Ibrahim, A. E., Hashem, H., Elhenawee, M., & Saleh, H. (2020). Core–shell particles and monolithic columns; tools for simultaneous LC analysis of avanafil, sildenafil, apomorphine, trazodone, yohimbine, tramadol and dapoxetine in pharmaceutical dosage forms, counterfeit products and human plasma. *RSC Advances*, 10(3), 1379–1387. <https://doi.org/10.1039/C9RA08717F>

ICH. (2005). *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry* . <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry>

NIH. (2023). *PubChem Compound Summary for CID 31404, Butylated Hydroxytoluene*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_6-ditert-butyl-4-methylphenol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_6-ditert-butyl-4-methylphenol).

NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria.

[https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4010/seeco11\\_C/seeco11\\_C.htm](https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4010/seeco11_C/seeco11_C.htm)

NMX-F-223-SCFI-2011 ALIMENTOS – ACEITE VEGETAL COMESTIBLE – ESPECIFICACIONES.

<http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/2010/nmx-f-223-scfi-2011.pdf>

Jakovljević, M., Vladić, J., Vidović, S., Pastor, K., Jokić, S., Molnar, M., & Jerković, I. (2020). Application of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Rutin and Rosmarinic Acid from *Satureja montana* L. and Evaluation of the Extracts Antiradical Activity. *Plants*, 9(2), 153. <https://doi.org/10.3390/plants9020153>

Jurić, T., Uka, D., Holló, B. B., Jović, B., Kordić, B., & Popović, B. M. (2021). Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 343, 116968. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116968>

Karami, F., & Shokrollahi, A. (2023). Simultaneous Preconcentration of Fast Green FCF and Rhodamine B Using Deep Eutectic Solvent and Determination via High-Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2023, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2023/8797355>

- Kim, J.-M., Choi, S.-H., Shin, G.-H., Lee, J.-H., Kang, S.-R., Lee, K.-Y., Lim, H.-S., Kang, T. S., & Lee, O.-H. (2016). Method validation and measurement uncertainty for the simultaneous determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils commonly consumed in Korea. *Food Chemistry*, 213, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.053>
- Kokosa, J. M., & Przyjazny, A. (2022). Green microextraction methodologies for sample preparations. *Green Analytical Chemistry*, 3, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2022.100023>
- Lehotay, S. J., Mastovska, K., Amirav, A., Fialkov, A. B., Martos, P. A., Kok, A. de, & Fernández-Alba, A. R. (2008). Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 1070–1090. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.004>
- Lenoir, D., Schramm, K.-W., & Lalah, J. O. (2020). Green Chemistry: Some important forerunners and current issues. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100313. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100313>
- Li, G., Zhu, T., & Lei, Y. (2015). Choline chloride-based deep eutectic solvents as additives for optimizing chromatographic behavior of caffeic acid. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32(10), 2103–2108. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0054-6>
- Liu, W., Zhang, K., Chen, J., & Yu, J. (2018). Ascorbic acid and choline chloride: A new natural deep eutectic solvent for extracting tert-butylhydroquinone

antioxidant. *Journal of Molecular Liquids*, 260, 173–179.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.092>

Liu, W., Zhang, K., Yu, J., & Bi, Y. (2017). A Green Ultrasonic-Assisted Liquid-Liquid Microextraction Based on Deep Eutectic Solvent for the HPLC-UV Determination of TBHQ in Edible Oils. *Food Analytical Methods*, 10(9), 3209–3215.  
<https://doi.org/10.1007/s12161-017-0891-5>

Liu, W., Zong, B., Wang, X., Yang, G., & Yu, J. (2022). Deep eutectic solvents as switchable solvents for highly efficient liquid–liquid microextraction of phenolic antioxidant: Easily tracking the original TBHQ in edible oils. *Food Chemistry*, 377, 131946. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131946>

Liu, W., Zong, B., Yu, J., & Bi, Y. (2018). Ultrasonic-Assisted Liquid-Liquid Microextraction Based on Natural Deep Eutectic Solvent for the HPLC-UV Determination of Tert-Butylhydroquinone from Soybean Oils. *Food Analytical Methods*, 11(6), 1797–1803. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1174-5>

Liu, Y., Sun, K., Shao, C., Shi, X., Zeng, J., Guo, R., & Zhang, B. (2021). Performance of nanoflow liquid chromatography using core-shell particles: A comparison study. *Journal of Chromatography A*, 1648, 462218.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462218>

Lord, H., & Pawliszyn, J. (2000). Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 17–63. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00836-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00836-0)

- Manivannan, M., & Rajendran, S. (2011). Investigation of inhibitive action of urea-Zn<sup>2+</sup> system in the corrosion control of carbon steel in sea water. *Int. J. Eng. Sci. Technol*, 3(11), 8048-8060.
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., & Cert, A. (2001). Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185–2192. <https://doi.org/10.1021/jf0013205>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para la Química Analítica* (Ed. Prentice Hall Pearson Education, Ed.; 4a Edición).
- Miskam, M., Sanagi, M. M., & Keyon, A. S. A. (2020). Liquid Phase Microextraction. In *Advances in Liquid Phase Microextraction*. Penerbit USM.
- Müller, S., Möder, M., Schrader, S., & Popp, P. (2003). Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 985(1–2), 99–106. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01803-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01803-4)
- Nakhle, L., Kfoury, M., Mallard, I., Landy, D., & Greige-Gerges, H. (2021). Microextraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(5), 3747–3759. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01255-2>

- Namieśnik, J. (2001). Green analytical chemistry – Some remarks. *Journal of Separation Science*, 24(2), 151–153. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20010201\)24:2<151::AID-JSSC151>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20010201)24:2<151::AID-JSSC151>3.0.CO;2-4)
- Nowak, P. M., Wietecha-Postuszny, R., & Pawliszyn, J. (2021). White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116223>
- Ozturk, B., Parkinson, C., & Gonzalez-Miquel, M. (2018). Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, 206, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052>
- Pawliszyn, J. (2012). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists* (J. Bayona, J. Pawliszyn, P. Dugo, X. C. Le, H. K. Lee, X.-F. Li, & H. Lord, Eds.; 1st ed.). Academic Press.
- Peng, X., Duan, M.-H., Yao, X.-H., Zhang, Y.-H., Zhao, C.-J., Zu, Y.-G., & Fu, Y.-J. (2016). Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. *Separation and Purification Technology*, 157, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.065>
- Perkins, S. L., Painter, P., & Colina, C. M. (2013). Molecular Dynamic Simulations and Vibrational Analysis of an Ionic Liquid Analogue. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(35), 10250–10260. <https://doi.org/10.1021/jp404619x>
- Perrin, C., & Meyer, L. (2003). Simultaneous determination of ascorbyl palmitate and nine phenolic antioxidants in vegetable oils and edible fats by HPLC. *JAOCS*,

*Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(2), 115–118.

<https://doi.org/10.1007/S11746-003-0661-9/METRICS>

Plastiras, O. E., Andreasidou, E., & Samanidou, V. (2020). Microextraction Techniques with Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 25(24), 6026. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules25246026>

Płotka, J., Tobiszewski, M., Sulej, A. M., Kupka, M., Górecki, T., & Namieśnik, J. (2013). Green chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1307, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>

Płotka-Wasyłka, J. (2018). A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, 181, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.013>

Płotka-Wasyłka, J., & Wojnowski, W. (2021). Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chemistry*, 23(21), 8657–8665. <https://doi.org/10.1039/D1GC02318G>

Poole, C. F. (2020). Solvent Selection for Liquid-Phase Extraction. In *Liquid-Phase Extraction* (pp. 45–89). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00002-5>

Portillo Castillo, O. J., Castro Ríos, R., Chávez Montes, A., González Horta, A., Cavazos Rocha, N., Granados Guzmán, G., Waksman de Torres, N., & Garza Tapia, M. (2022). Fabrication and Characterization of a Laboratory–Made New Coating Based on 1-Decyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate for SPME Fibers, an Exploration to its Application in Extractions by Direct-Immersion Mode.

*Journal of the Mexican Chemical Society*, 66(2).

<https://doi.org/10.29356/jmcs.v66i2.1693>

Prabhune, A., & Dey, R. (2023). Green and sustainable solvents of the future: Deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 379, 121676. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121676>

Pradanas-González, F., Aragoneses-Cazorla, R., Merino-Sierra, M. Á., Andrade-Bartolomé, E., Navarro-Villoslada, F., Benito-Peña, E., & Moreno-Bondi, M. C. (2023). Extracting mycotoxins from edible vegetable oils by using green, ecofriendly deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 429, 136846. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136846>

Preti, R. (2016). Core-Shell Columns in High-Performance Liquid Chromatography: Food Analysis Applications. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3189724>

Rashidi, L., Gholami, Z., Nanvazadeh, S., & Shabani, Z. (2016). Rapid Method for Extracting and Quantifying Synthetic Antioxidants in All Edible Fats and Oils. *Food Analytical Methods*, 9(9), 2682–2690. <https://doi.org/10.1007/S12161-016-0443-4/TABLES/7>

Roda, A., Matias, A., Paiva, A., & Duarte, A. (2019). Polymer Science and Engineering Using Deep Eutectic Solvents. *Polymers*, 11(5), 912. <https://doi.org/10.3390/polym11050912>

Saad, B., Sing, Y. Y., Nawj, M. A., Hashim, N. H., Mohamed Ali, A. S., Saleh, M. I., Sulaiman, S. F., Talib, K. M., & Ahmad, K. (2007). Determination of synthetic

phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*, 105(1), 389–394. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.12.025>

Santaladchaiyakit, Y., Sirijan, A., Wongchalee, M., Phurimsak, C., Baoulan, A., Gamonchuang, J., Boontongto, T., Vichapong, J., Burakham, R., & Srijaranai, S. (2022). A simple co-precipitation sorbent-based preconcentration method for the analysis of fungicides in water and juice samples by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection. *Journal of Analytical Science and Technology*, 13(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s40543-022-00356-z>

Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Food/Nahrung*, 44(3), 158–163. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20000501\)44:3<158::AID-FOOD158>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20000501)44:3<158::AID-FOOD158>3.0.CO;2-L)

Sin, D. W. M., Wong, Y. C., Mak, C. Y., Sze, S. T., & Yao, W. Y. (2006). Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 784–791. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2005.12.005>

Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/cr300162p>

Spietelun, A., Marcinkowski, Ł., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2013). Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*, 1321. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.030>

- Stachniuk, A., & Fornal, E. (2016). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1654–1665. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0342-0>
- Subramanian, P., & Anandharamakrishnan, C. (2023). Extraction of bioactive compounds. In *Industrial Application of Functional Foods, Ingredients and Nutraceuticals* (pp. 45–87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824312-1.00002-9>
- Swartz, M., & Ira Krull. (2015). *Analytical Method Validation: Accuracy in Quantitation* (LCGC North America, Ed.).
- Tobiszewski, M., Marć, M., Gałuszka, A., & Namieśnik, J. (2015). Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. *Molecules*, 20(6), 10928–10946. <https://doi.org/10.3390/molecules200610928>
- Tobiszewski, M., Namieśnik, J., & Pena-Pereira, F. (2017). Environmental risk-based ranking of solvents using the combination of a multimedia model and multi-criteria decision analysis. *Green Chemistry*, 19(4), 1034–1042. <https://doi.org/10.1039/C6GC03424A>
- Valcárcel Cases, M., Lucena Rodríguez, R., & Cárdenas Aranzana, S. (2017). *Analytical Microextraction Techniques*. Bentham Science Publishers. [https://www.google.com.mx/books/edition/Analytical\\_Microextraction\\_Techniques/5XGZDgAAQBAJ?hl=es&gbpv=1](https://www.google.com.mx/books/edition/Analytical_Microextraction_Techniques/5XGZDgAAQBAJ?hl=es&gbpv=1)
- Vaz, I. C. M., Lobo Ferreira, A. I. M. C., Silva, G. M. C., Morgado, P., Abranches, D. O., Bastos, M., Santos, L. M. N. B. F., Filipe, E. J. M., & Coutinho, J. A. P. (2023).

The path towards type V deep eutectic solvents: inductive effects and steric hindrance in the system tert-butanol + perfluoro tert-butanol. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25(16), 11227–11236. <https://doi.org/10.1039/D3CP00701D>

Vieira-Sellaï, L., Quintana, M., Diop, O., Mercier, O., Tarrit, S., Raimi, N., Ba, A., Maunit, B., & Galmier, M.-J. (2022). Green HPLC quantification method of lamivudine, zidovudine and nevirapine with identification of related substances in tablets. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(3), 695–704. <https://doi.org/10.1080/17518253.2022.2129463>

Waisundara, V. (2021). *Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. IntechOpen.

Wang, H., Liu, X., Tu, M., Xu, X., Yang, S., & Chen, D. (2022). Current sample preparation methods and analytical techniques for the determination of synthetic antioxidants in edible oils. *Journal of Separation Science*, 45(20), 3874–3886. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200358>

Wenkui Li, Wenying Jian, & Yunlin Fu. (2019). *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* (John Wiley & Sons, Ed.).

Werner, J., Grześkowiak, T., & Zgoła-Grześkowiak, A. (2022). A polydimethylsiloxane/deep eutectic solvent sol-gel thin film sorbent and its application to solid-phase microextraction of parabens. *Analytica Chimica Acta*, 1202, 339666. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339666>

Wojeicchowski, J. P., Marques, C., Igarashi-Mafra, L., Coutinho, J. A. P., & Mafra, M. R. (2021). Extraction of phenolic compounds from rosemary using choline

chloride – based Deep Eutectic Solvents. *Separation and Purification Technology*, 258, 117975. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117975>

Xu, S., Liu, L., Wang, Y., Zhou, D., Kuang, M., Fang, D., Yang, W., Wei, S., Xiao, A., & Ma, L. (2016a). Simultaneous determination of six synthetic phenolic antioxidants in edible oils using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 39(16), 3205–3211. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201600434>

Xu, S., Liu, L., Wang, Y., Zhou, D., Kuang, M., Fang, D., Yang, W., Wei, S., Xiao, A., & Ma, L. (2016b). Simultaneous determination of six synthetic phenolic antioxidants in edible oils using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 39(16), 3205–3211. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600434>

Xu, S., Liu, L., Wang, Y., Zhou, D., Kuang, M., Fang, D., Yang, W., Wei, S., Xiao, A., & Ma, L. (2016c). Simultaneous determination of six synthetic phenolic antioxidants in edible oils using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 39(16), 3205–3211. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600434>

Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Wang, X., Martínez, M., Anadón, A., & Martínez, M. A. (2021). Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chemistry*, 353, 129488. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129488>

- Yabré, M., Ferey, L., Somé, I., & Gaudin, K. (2018). Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules*, 23(5), 1065. <https://doi.org/10.3390/molecules23051065>
- Yamini, Y., Rezazadeh, M., & Seidi, S. (2019). Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.010>
- Yang, M. H., Lin, H. J., & Choong, Y. M. (2002). A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Research International*, 35(7), 627–633. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00164-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00164-8)
- Yanishlieva, N. V., & Marinova, E. M. (2001). Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(11), 752–767. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200111\)103:11<752::AID-EJLT752>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200111)103:11<752::AID-EJLT752>3.0.CO;2-0)
- Yin, X., Zhong, Z., Bian, G., Cheng, X., & Li, D. (2020). Ultra-rapid, enhanced and eco-friendly extraction of four main flavonoids from the seeds of *Oroxylum indicum* by deep eutectic solvents combined with tissue-smashing extraction. *Food Chemistry*, 319, 126555. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126555>
- Zahn, S., Kirchner, B., & Mollenhauer, D. (2016). Charge Spreading in Deep Eutectic Solvents. *ChemPhysChem*, 17(21), 3354–3358. <https://doi.org/10.1002/cphc.201600348>

Zang, X.-H., Wu, Q.-H., Zhang, M.-Y., Xi, G.-H., & Wang, Z. (2009). Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60082-1](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1)

Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). Matrix Effects and Application of Matrix Effect Factor. *Bioanalysis*, 9(23), 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>

## **CAPÍTULO 10**

### **ANEXOS**

#### **10.1 Condiciones cromatográficas evaluadas para el desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHA y BHT.**

**Tabla XXV.** Condiciones cromatográficas de los métodos evaluados para la determinación de TBHQ, BHA y BHT.

<b>Método</b>	<b>1</b>			<b>2</b>			<b>3</b>		
<b>Fase móvil</b>	Fase A: Ácido fórmico 0.1%; Fase B: Etanol								
<b>Gradiente</b>	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B
	0	70	30						
	2	70	30						
	13	10	90	0	60	40	0	60	40
	15	10	90	10	0	100	5	0	100
	17	0	100	15	0	100	15	0	100
	19	0	100	18	60	40	18	60	40
	21	70	30	40	60	40	40	60	40
35	70	30							
<b>Método</b>	<b>4</b>			<b>5</b>			<b>6</b>		
<b>Fase móvil</b>	Fase A: Ácido fórmico 0.1%; Fase B: Etanol								
<b>Gradiente</b>	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B
	0	60	40	0	60	40	0	55	45
	5	0	100	3	0	100	10	0	100
	15	0	100	15	0	100	15	0	100
	18	60	40	18	60	40	18	55	45
	40	60	40	40	60	40	45	55	45

**Tabla XXV.** Condiciones cromatográficas de los métodos evaluados para la determinación de TBHQ, BHA y BHT

<b>Método</b>	<b>7</b>			<b>8</b>			<b>9</b>		
<b>Fase móvil</b>	Fase A: Ácido acético 0.1%; Fase B: Etanol								
<b>Gradiente</b>	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B
	0	55	45	0	55	45	0	55	45
	10	0	100	10	0	100	15	0	100
	20	0	100	25	0	100	30	0	100
	25	55	45	30	55	45	35	55	45
45	55	45	55	55	45	60	55	45	
<b>Método</b>	<b>10</b>			<b>11</b>			<b>12</b>		
<b>Fase móvil</b>	Fase A: Ácido acético 0.1%; Fase B: Etanol								
<b>Gradiente</b>	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Tiempo (min)	Fase A	Fase B
	0	55	45	0	55	45	0	55	45
	15	0	100	15	0	100	5	55	45
	30	0	100	25	0	100	10	30	70
	38	55	45	30	55	45	15	30	70
	60	55	45	50	55	45	20	0	100
							25	0	100
						30	55	45	
						50	55	45	

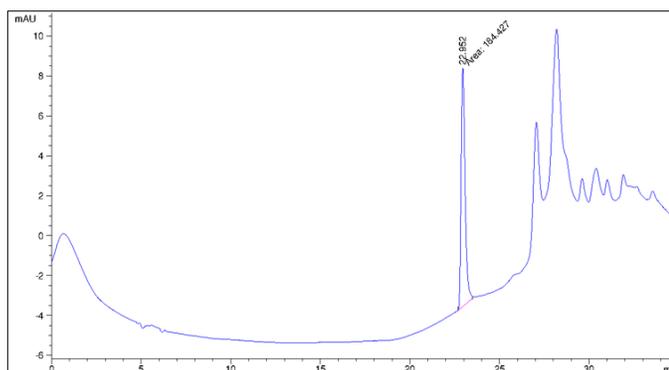
**Tabla XXV.** Condiciones cromatográficas de los métodos evaluados para la determinación de TBHQ, BHA y BHT

<b>Método</b>	<b>13</b>		
<b>Fase móvil</b>	Fase A: Ácido acético 0.1%; Fase B: Etanol		
<b>Gradiente</b>	Tiempo (min)	Fase A	Fase B
	0	55	45
5	30	70	
10	30	70	
15	0	100	
20	0	100	
25	55	45	
45	55	45	

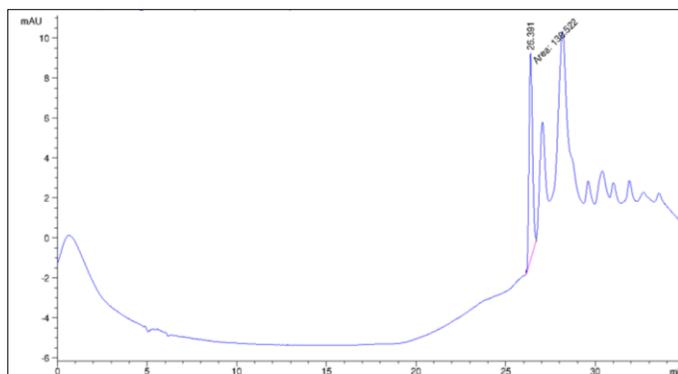
## 10.2 Cromatogramas obtenidos en el desarrollo del método cromatográfico para la determinación de TBHQ, BHA y BHT.

En las siguientes figuras, se muestran cromatogramas representativos obtenidos en las condiciones evaluadas durante el desarrollo del método cromatográfico para la separación y cuantificación del TBHQ, BHA y BHT.

En todos los casos se utilizó el cromatógrafo HP 1100 y la columna Kinetex C18.

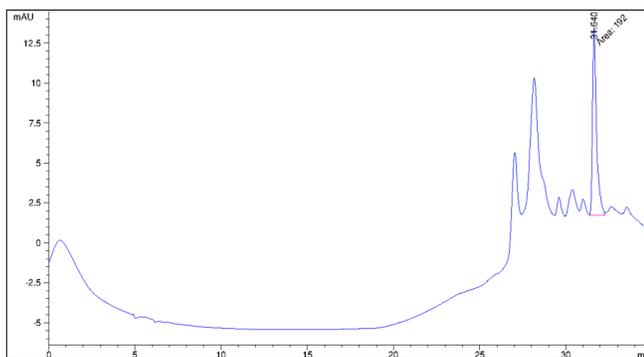


**Figura 29.** Cromatograma obtenido para una solución de TBHQ (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico 0.1%,30:70) con el método 1. Flujo de 0.1 mL/min, 40°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-2 min, 70% A y 30% B; 2-13 min, 70-10% A y 30-90% B ;13-15 min 10% A y 90% B; 15-17 min, 10-0% A y 90-100% B; 17-19 min, 0% A y 100% B; 19-21 min, 0-70% A y 100-30% B; 21-35 min 70% A y 30% B.



**Figura 30.** Cromatograma obtenido para una solución de BHA (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 30:70) con el método 1.

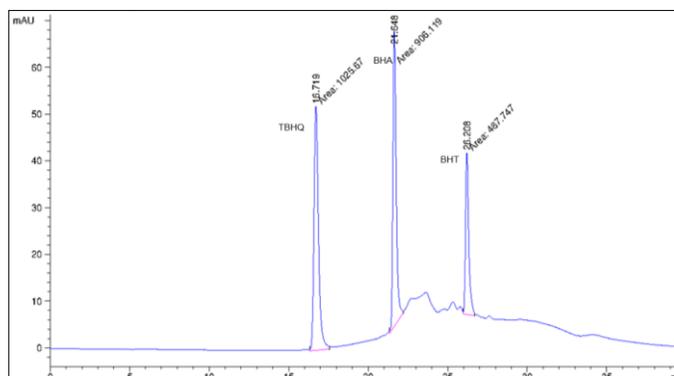
Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 40°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-2 min, 70% A y 30% B; 2-13 min, 70-10% A y 30-90% B ;13-15 min 10% A y 90% B; 15-17 min, 10-0% A y 90-100% B; 17-19 min, 0% A y 100% B; 19-21 min, 0-70% A y 100-30% B; 21-35 min 70% A y 30% B.



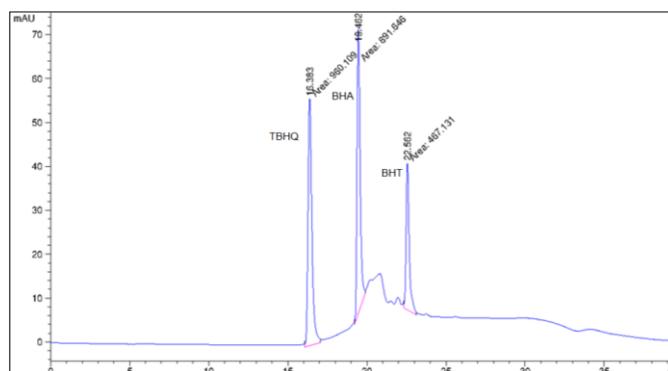
**Figura 31.** Cromatograma obtenido para una solución de BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 30:70) con el método 1.

Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 40°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-2 min, 70% A y 30% B; 2-13 min, 70-10% A y 30-90% B ;13-15 min 10% A y 90% B; 15-17 min, 10-0%

A y 90-100% B; 17-19 min, 0% A y 100% B; 19-21 min, 0-70% A y 100-30% B;  
21-35 min 70% A y 30% B.

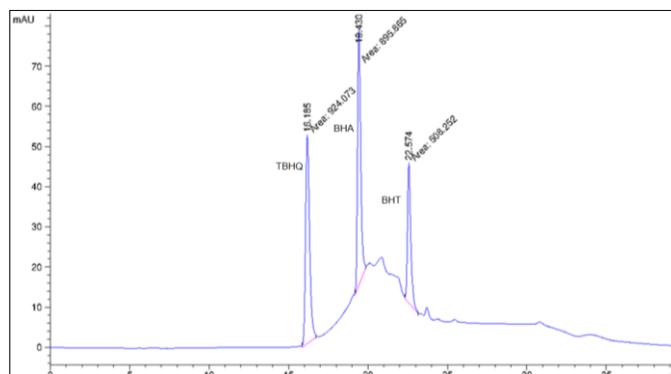


**Figura 32.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 2. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 40°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A) y etanol (B), utilizando el gradiente como se menciona a continuación: 0-10 min, 60-10% A y 40-90% B; 10-15 min, 10% A y 90% B ;15-18 min 10-60% A y 90-40% B; 18-40 min, 60% A y 40% B.

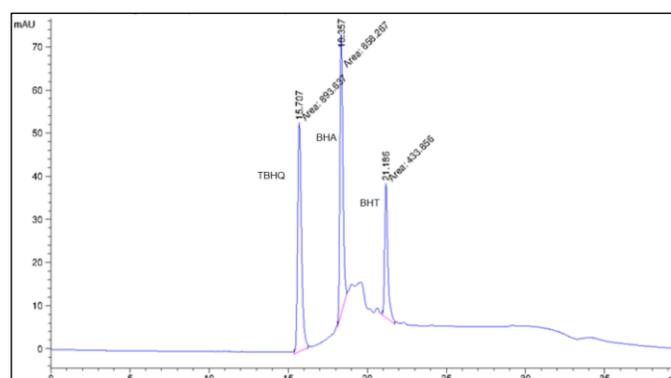


**Figura 33.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 3. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 40°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-5 min, 60-

0% A y 40-100% B; 5-15 min, 0% A y 100% B ;15-18 min 0-60% A y 100-40%  
B; 18-40 min, 60% A y 40% B.

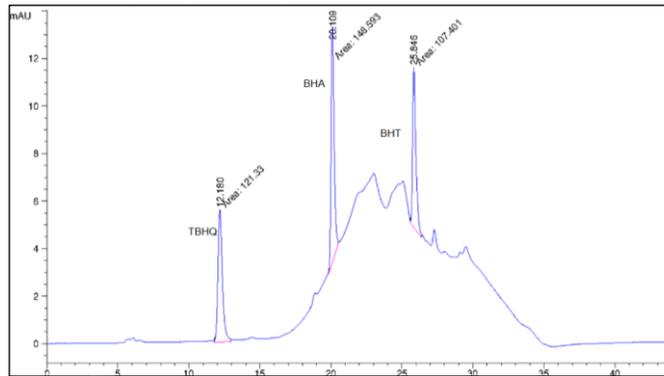


**Figura 34.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 4. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-5 min, 60-10% A y 40-90% B; 5-15 min, 10% A y 90% B ;15-18 min 10-60% A y 90-40% B; 18-40 min, 60% A y 40% B.

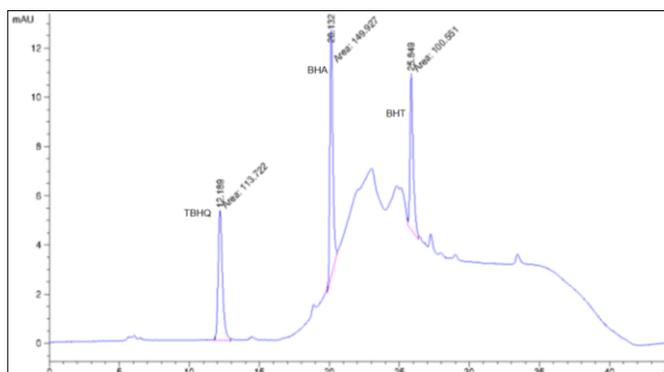


**Figura 35.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (100 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido fórmico, 40:60) con el método 5. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min,

45°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-3 min, 60-10% A y 40-90% B; 3-15 min, 10% A y 90% B ;15-18 min 10-60% A y 90-40% B; 18-40 min, 60% A y 40% B.

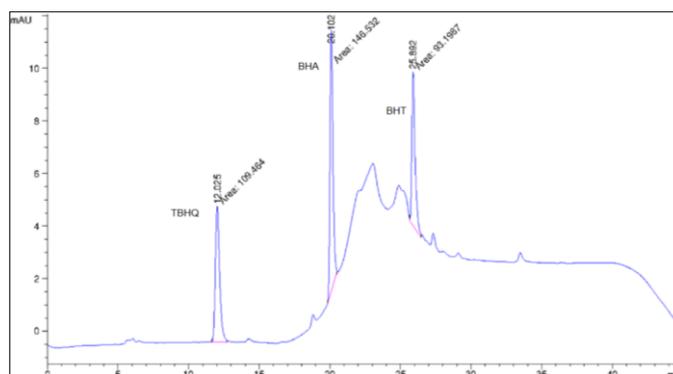


**Figura 36.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 6. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-10 min, 55-0% A y 45-100% B; 10-15 min, 0% A y 100% B ;15-18 min 0-55% A y 100-45% B; 18-45 min, 55% A y 45% B.

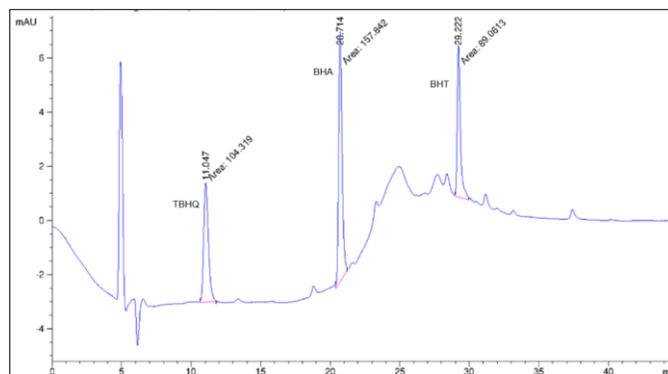


**Figura 37.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el

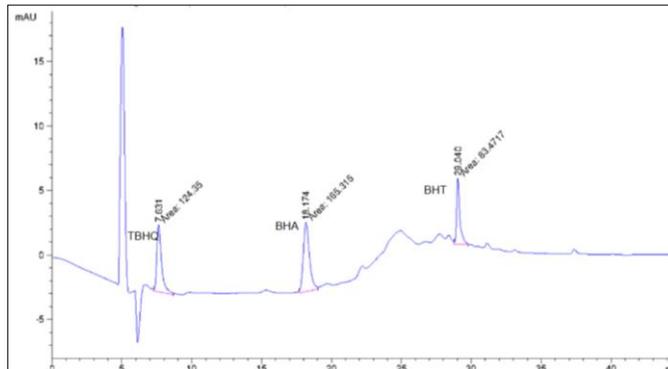
método 7. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-10 min, 55-0% A y 45-100% B; 10-20 min, 0% A y 100% B ;20-25 min 0-55% A y 100-45% B; 25-45 min, 55% A y 45% B.



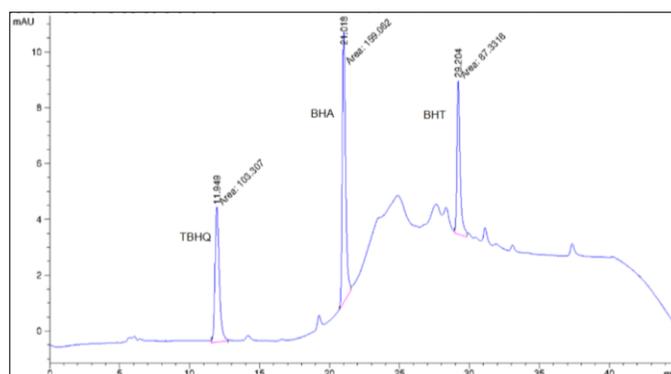
**Figura 38.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 8. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-10 min, 55-0% A y 45-100% B; 10-25 min, 0% A y 100% B ;25-30 min 0-55% A y 100-45% B; 30-55 min, 55% A y 45% B.



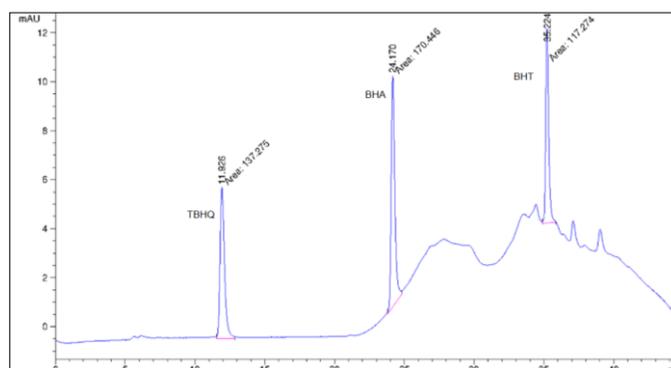
**Figura 39.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 9. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-15 min, 55-0% A y 45-100% B; 15-30 min, 0% A y 100% B ;30-35 min 0-55% A y 100-45% B; 35-60 min, 55% A y 45% B.



**Figura 40.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 10. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-15 min, 55-0% A y 45-100% B; 15-30 min, 0% A y 100% B ;30-38 min 0-55% A y 100-45% B; 38-60 min, 55% A y 45% B.

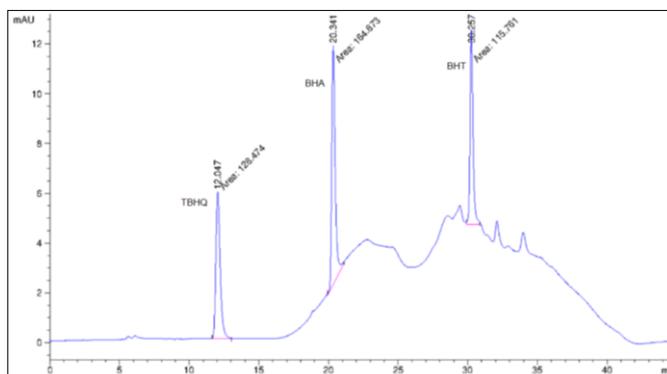


**Figura 41.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 11. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-15 min, 55-0% A y 45-100% B; 15-25 min, 0% A y 100% B ;25-30 min 0-55% A y 100-45% B; 30-50 min, 55% A y 45% B.



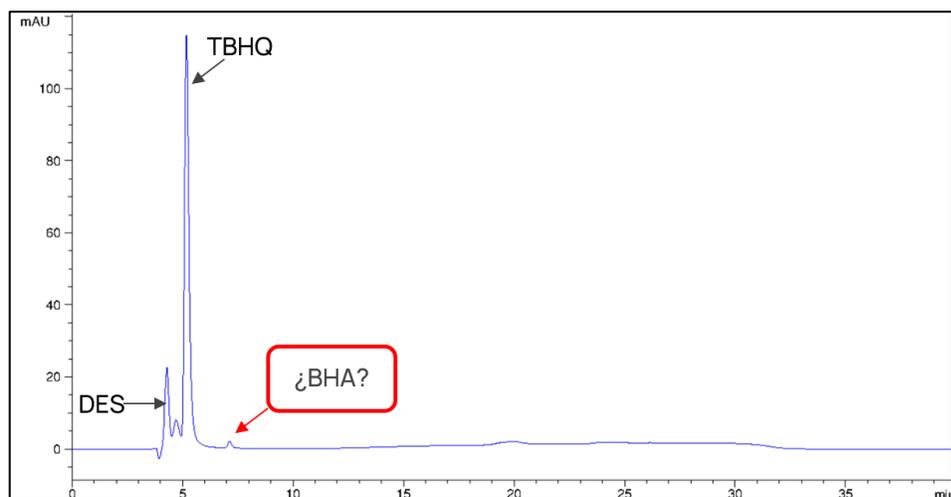
**Figura 42.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 12. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-5 min, 55% A y 45% B; 5-10 min, 55-30% A y 45-70% B; 10-15 min 30% A y 70% B; 15-20

min, 30-0% A y 70-100% B; 20-25 min, 0% A y 100% B; 25-30 min, 0-55% A y 100-45% B; 30-50 min, 55% A y 45% B.

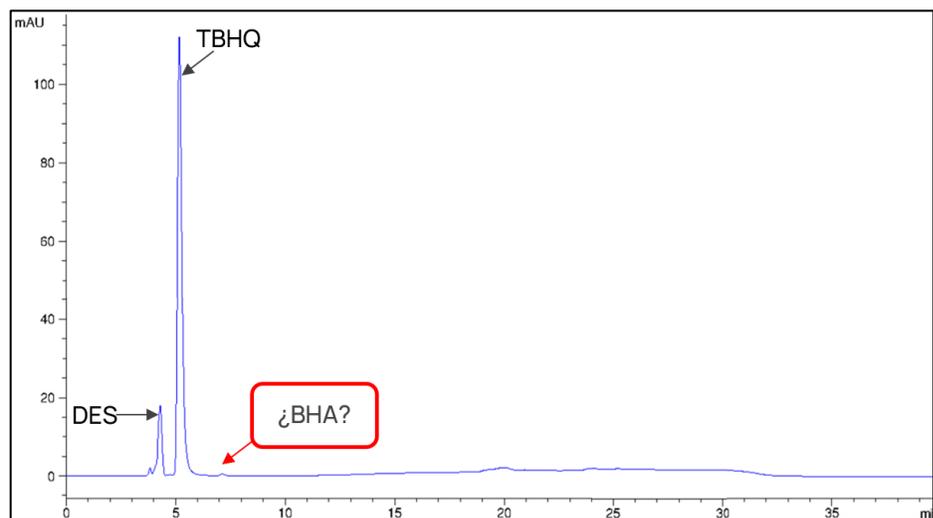


**Figura 43.** Cromatograma obtenido para una solución mezcla de TBHQ, BHA y BHT (10 mg/L en fase móvil compuesta por etanol: ácido acético, 45:55) con el método 13. Cromatógrafo HP 1100. Columna Kinetex C18, flujo de 0.1 mL/min, 45°C. Fase móvil: ácido acético 0.1% (A) y etanol (B). Gradiente: 0-5 min, 55-30% A y 45-70% B; 5-10 min, 30% A y 70% B; 10-15 min 30-0% A y 70-100% B; 15-20 min, 0% A y 100% B; 20-25 min, 0-55% A y 100-45% B; 25-45 min, 55% A y 45% B.

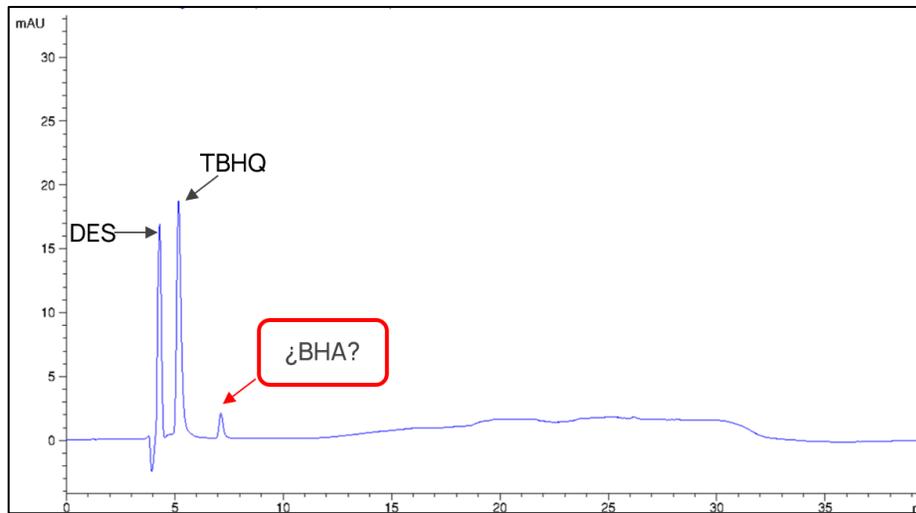
### 10.3 Cromatogramas obtenidos del análisis de muestras de aceite vegetal comestible comerciales.



**Figura 44.** Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de aceite vegetal comestible marca Mazola.



**Figura 45.** Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de aceite vegetal comestible marca Vita Premium.



**Figura 46.** Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de aceite vegetal comestible marca Kartamus.