



UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE DE CONCEPCIÓN – REY BALDUINO DE BÉLGICA

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE CONCEPCION - REY BALDUINO DE BÉLGICA

Desarrollo de Protocolos Analítico y de Validación, y Evaluación Económica para la Implementación de un Método por Cromatografía de Gases para Cuantificar EPA y DHA en Aceite de Pescado en un Laboratorio de Servicios Orientado al Control Interno de Empresas Pesqueras

Trabajo de Titulación para optar al Título de
Ingeniero de Ejecución Químico Mención
Control

Raúl Mauricio Martínez Calderón

Profesor guía: Juan Pablo Inostroza Saldias

Concepción, 2025



AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, agradezco a Dios, quien me ha acompañado en todo momento, la fe me ha permitido alcanzar objetivos que parecían difíciles de lograr, siempre con perseverancia. Agradezco también a mi esposa, Alicia, quien nunca dudó de mí cuando decidí estudiar en la universidad en una etapa de mi vida en la que ya había formado una familia con hijos universitarios. Tamara ha sido indispensable con su apoyo, y Raúl ha estado siempre presente en este camino. Este logro también es de ellos.

Expreso mi gratitud a mi profesor guía, don Juan Pablo Inostroza, quien me dio el empujón inicial y me mostró el camino correcto. También al profesor Víctor Lizama, quien compartió su valiosa experiencia para ayudarme a alcanzar mis objetivos. No puedo dejar de mencionar a mi compañero Gustavo Becker, cuya generosidad al compartir su experiencia laboral fue clave para cumplir con los objetivos de este trabajo

RESUMEN

Este proyecto propone la implementación de un **método analítico** para la cuantificación de los **ácidos grasos esenciales EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico)** en aceite de pescado mediante cromatografía de gases (**GC**). Estos compuestos, ampliamente reconocidos por sus beneficios para la salud cardiovascular y el desarrollo cognitivo, son componentes clave en la industria alimentaria y farmacéutica (**Calder, 2015**). El análisis preciso de EPA y DHA es fundamental para garantizar la calidad del aceite de pescado, un producto que ha ganado relevancia en Chile como fuente de ácidos grasos omega-3 (**FAO, 2021**).

La metodología propuesta incluye un proceso de **esterificación** previo, donde los ácidos grasos libres son convertidos en ésteres metílicos para su análisis cromatográfico. Este paso, recomendado por normativas internacionales aceptadas en Chile como **AOAC 991.39** y **AOCS Ce 1b-89**, asegura la volatilidad y estabilidad de los compuestos durante el análisis (**Christie, 1993; AOAC, 1991**). Además, el proyecto contempla un protocolo de validación del método según los lineamientos de la Guía de Validación de Métodos Analíticos de **SERNAPESCA**, para garantizar su precisión, exactitud y reproducibilidad en el contexto nacional (**SERNAPESCA, 2018**).

En términos económicos, el proyecto evaluará la factibilidad financiera de implementar este método en un laboratorio con un rol estratégico en el **control interno** de calidad para la industria pesquera. El análisis de costos incluirá proyecciones de ingresos bajo escenarios **pesimistas, moderados y optimistas**, considerando métricas clave como el flujo de caja y el valor actual neto (**VAN**) y la tasa interna de retorno (**TIR**) (**Lumley, 2001**).

Este proyecto busca diversificar los servicios ofrecidos por el laboratorio, fortalecer su relevancia en la industria pesquera y responder a la creciente demanda de análisis especializados en aceites de pescado, todo ello alineado con normativas nacionales e internacionales.



ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Introducción 1

1.1. Objetivo General..... 2

1.2. Objetivos específicos 2

1.3. Justificación del proyecto 2

1.4. Metodología..... 4

1.4.1. Preparación de la Muestra..... 4

1.4.2. Esterificación 4

1.4.3. Condiciones de Esterificación..... 4

1.4.4. Análisis Cromatográfico..... 4

1.4.5. Equipo Utilizado 4

1.4.6. Protocolo de Validación del Método 5

1.4.7. Parámetros de Validación..... 5

1.4.8. Documentación del Protocolo 5

1.4.9. Estudio de Costos y Análisis del Flujo de Caja 5

1.4.10. Identificación de Costos 5

1.4.11. Proyecciones de Ingresos..... 6

1.4.12. Análisis del Flujo de Caja 6

1.5. Desarrollo 6

1.6. Conclusión del Capítulo 1: Introducción..... 7

CAPÍTULO 2. Protocolo del metodo analítico..... 8

2.1. Introducción..... 8

2.2. Cromatografía de Gases 8

2.2.1. Introducción a la Cromatografía de Gases..... 8

2.2.2. Fuente de Gas Portador..... 9

2.2.3. Justificación Técnica del Uso de Hidrógeno 10

2.2.4. Ventajas económicas..... 11

2.2.5. Comparación con el Nitrógeno 11

2.2.6. Seguridad y Precauciones 11

2.2.7. Impacto en el Proyecto 11

2.2.8. Sistema de Inyección:..... 12

2.2.9. Justificación del Uso de Inyector Splitless 13

2.2.10. Columna Cromatográfica..... 14



2.2.11.	Horno	17
2.2.12.	Detector	19
2.2.13.	Sistema de Registro de Datos.....	21
2.3.	Ventajas de la Cromatografía de Gases	22
2.3.1.	Aplicación en el Análisis de EPA y DHA	23
2.3.2.	Similitud estructural con otros ácidos grasos:.....	23
2.3.3.	Comparación con Otras Técnicas Analíticas.....	23
2.3.4.	Consideraciones Técnicas	23
2.3.5.	Relación Costo-Beneficio	24
2.3.6.	Impacto en la Industria Pesquera.....	24
2.3.7.	Conclusión.....	24
2.4.	Esterificación en el Análisis del Aceite de Pescado	24
2.4.1.	Química del Proceso	25
2.4.2.	Impacto en el Protocolo Analítico	25
2.4.3.	Factores para considerar en la selección del catalizador	25
2.4.4.	Normativas Aplicables	26
2.5.	Protocolo del metodo analitico.....	26
2.5.1.	Objetivo.....	26
2.5.2.	Alcance.....	27
2.5.3.	Elementos de protección personal	27
2.5.4.	Riesgos asociados al procedimiento y medidas preventivas.	27
2.5.5.	Materiales y Equipos	27
2.5.6.	Reactivos	27
2.5.7.	Soluciones	28
2.5.8.	Preparación de la Muestra y del Patrón Interno	28
2.5.9.	Proceso de Saponificación y Esterificación	28
2.5.10.	Extracción y Preparación para el Análisis.....	29
2.5.11.	Análisis por Cromatografía de Gases	29
2.5.12.	Cuantificación de Resultados	29
2.5.13.	Control de Calidad	30
2.6.	Antecedentes del método.Analitico.....	30
2.7.	Conclusión del Capítulo 2: Protocolo del Método Analítico	34
CAPÍTULO 3.	Protocolo de validación.....	35



3.1.	Introducción al protocolo de validacion.....	35
3.1.1.	Parámetros para validar	35
3.1.2.	Importancia de la validación del método.....	36
3.1.3.	Objetivos de la Validación	37
3.2.	Protocolo.....	37
3.2.1.	Linealidad	37
3.2.2.	Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).....	40
3.2.3.	Exactitud.....	43
3.2.4.	Límites de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ).....	46
3.2.5.	Especificidad.....	50
3.3.	Conclusión del Capítulo 3: Protocolo de Validación	52
CAPÍTULO 4.	Estudio de costos	54
4.1.	Introduccion.....	54
4.2.	Importancia del Estudio de Costos	54
4.2.1.	Viabilidad Financiera.....	55
4.2.2.	Optimización de Recursos	55
4.2.3.	Proyección de Escenarios	55
4.2.4.	Posicionamiento Competitivo	55
4.2.5.	Toma de Decisiones Basada en Datos	55
4.3.	Inventario.....	56
4.4.	Costos por categoría.....	58
4.5.	Costos operativos anuales.....	58
4.6.	Mantenimiento de equipos.....	58
4.7.	Resumen de Costos Operativos Anuales	58
4.8.	Flujos de caja	59
4.8.1.	Escenario pesimista con 5 análisis por semana.....	59
4.8.2.	Escenario moderado con 10 análisis por semana	65
4.8.3.	Escenario optimista con 15 análisis por semana	68
4.8.4.	Comparación grafica de los tres escenarios	71
4.9.	Conclusión del capítulo 4 ESTUDIO de costos	72
Referencias.....		73

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1-1. Número de análisis por año.	4
Fig.2-1. Esquema de un cromatógrafo de gases. Disponible en: https://www.lifeder.com/cromatografia-de-gases/ . Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.	9
Fig. 2-2. Inyector Split/Splitless. La válvula del divisor está siempre abierta en el modo Split, en el modo Splitless está inicialmente cerrada y después de un tiempo se abre. El protocolo de análisis se usa un inyector Splitless. Disponible en http://gcailin.blogspot.com/2013/12/cromatografia-que-es-cromatografia.html //. Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.	12
Fig.2-3. Columnas capilares. Disponible en: https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/11/cromatografia-de-gases.html . Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.	15
Fig.2-4. Esquema de FID Extraído de: https://www.chemicool.com/definition/flameionization_chromatography_detector_fid.html . Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.....	19
Fig. 2-5. Software para cromatografía de gases. Extraído de: https://www.agsanalitica.com/es/producto/Clarity . Fecha de acceso: 09 de diciembre de 2024.	22
Fig. 2-6. Ésteres metílicos de ácidos grasos de suave gelatina encapsulada, el aceite de lacha vapor desodorizado (muestra de estudio en colaboración 1) analizado en una sílice fundida flexible columna capilar (30 m × 0,25 mm), recubiertos con Supelcowax-10. Ver tabla 1.	31
Fig. 2-7. Ésteres etílicos de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao un producto comercial suaves de gelatina encapsulada, Super EPA 500 (muestra de estudio de colaboración 2) analizado en una sílice fundida flexible columna capilar (30 m × 0,25 mm), recubiertos con Supelcowax-10, bajo las condiciones mencionadas en la técnica.	32
Fig. 2-8. Cromatograma de ésteres metílicos de aceite de hígado de bacalao (muestra de estudio colaborativo 3) analizados en una columna capilar flexible de sílice fundida (30 m 0,25 mm), recubierta con Supelcowax-10, en las condiciones indicadas en el método. Ver tabla 2.....	33
Fig. 3-1. Curva de calibración EPA.	39
Fig. 3-2. Curva de calibración DHA.	40
Fig. 3-3. Comparación de repetibilidad y reproducibilidad.	42
Fig. 3-4. Concentraciones añadidas vs. Concentraciones encontradas.	45
Fig. 3-5. Determinación de LOD y LOQ.	48
Fig. 3-6. Cromatograma de Especificidad: Separación de EPA, DHA e interferencia. ..	51
Fig. 4-1. Flujo de caja en un escenario pesimista.	64
Fig. 4-2. Flujo de caja acumulado en un escenario pesimista.	64
Fig. 4-3. Flujo de caja acumulado en un escenario moderado.	67
Fig. 4-4. Flujo de caja acumulado en un escenario optimista	70
Fig. 4-5. Comparación de los flujos de cajas de cada escenario.	71



INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Comparación de gases portadores para cromatografía de gases..... 10

Tabla 2-2. Comparación entre Modos Split y Splitless. 14

Tabla 2-3. Comparación entre columnas capilares y empacadas. 16

Tabla 2-4. Parámetros clave asociados al horno. 18

Tabla 2-5. Comparación de configuraciones de horno. 19

Tabla 2-6. Comparación con otros detectores 21

Tabla 2-7. Límites de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ) Mehaden: Es un pescado, que se utiliza como fertilizante, alimento para animales y cebo para la pesca, es una fuente importante de ácidos grasos omega -3..... 31

Tabla 2-8. Tiempos de retención y el porcentaje de área de ésteres metílicos de aceite de hígado de bacalao (muestra de estudio colaborativo 3)..... 32

Tabla 2-9. Análisis estadístico de los resultados de 6 aceites de pescado basados en los resultados recibidos de 6 laboratorios. 34

Tabla 3-1. Diluciones para calcular linealidad. 39

Tabla 3-2. Ejemplo de resultados de curva de calibración..... 39

Tabla 3-3. Ejemplo de tabla para repetibilidad. 42

Tabla 3-4. Ejemplo de tabla para reproductibilidad. 42

Tabla 3-5. Datos de repetibilidad y reproducibilidad. 42

Tabla 3-6. Resultados de exactitud..... 45

Tabla 3-7. Ejemplo de datos experimentales para calcular LOQ y LOD 47

Tabla 3-8. Tabla de resultados de especificidad. 51

Tabla 4-1. Inventario de evaluación de costos. 57

Tabla 4-2. Costos por categoría. 58

Tabla 4-3. Costos operativos anuales. 58

Tabla 4-4. Costos de mantención de equipo. 58

Tabla 4-5. Costos de arriendo del laboratorio. 58

Tabla 4-6. Costos operativos anuales. 58

Tabla 4-7. Inversión de equipos. 59

Tabla 4-8. Costos variables anual. 60

Tabla 4-9. Costos fijos anual. 60

Tabla 4-10. Reactivos por análisis. 61

Tabla 4-11. Flujo de caja pesimista. 62

Tabla 4-12. Costos variables. 65

Tabla 4-13. Flujo de caja escenario moderado..... 65

Tabla 4-14. Costos variables escenario optimista. 68

Tabla 4-15. Flujo de caja escenario optimista..... 68

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El aceite de pescado es ampliamente reconocido por sus beneficios nutricionales y funcionales debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga, como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (Valenzuela, 2022). Estos compuestos esenciales son valorados por su capacidad para prevenir enfermedades cardiovasculares y promover el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (Castro-González, 2002). Como resultado, la demanda de productos enriquecidos con DHA y EPA ha aumentado significativamente, consolidando al aceite de pescado como un recurso clave en las industrias alimentaria y farmacéutica. Lo que antes se consideraba un subproducto de la producción de harina de pescado, hoy se posiciona como un insumo esencial para garantizar la calidad de vida (Andrea Villalpando, 2019).

Para las industrias que trabajan con este producto, la cantidad de DHA y EPA en el aceite de pescado no es solo un dato técnico; es un indicador crucial de calidad. Investigaciones previas han destacado la necesidad de métodos analíticos confiables adaptados a las propiedades del aceite nativo, mientras que se ha demostrado la eficacia de la cromatografía de gases como técnica fundamental para cuantificar estos compuestos (Pinto Molina, 2015). Sin embargo, este análisis requiere un paso crucial: la esterificación. Este procedimiento químico permite convertir los ácidos grasos en ésteres metílicos más volátiles, facilitando así su análisis mediante cromatografía de gases (CCMAS, 2021).

La esterificación no solo asegura que los ácidos grasos no se degraden durante el proceso, sino que también garantiza que los resultados reflejen con precisión la composición original del aceite (Villalpando, 2019). Este paso es especialmente relevante en el análisis de los ácidos grasos esenciales, ya que afecta directamente la confiabilidad de los datos obtenidos. Por tanto, la selección de un método de esterificación adecuado es un punto central en el desarrollo de este proyecto.

El laboratorio, que actualmente realiza análisis de humedad, lípidos, antioxidantes, desempeña un papel crucial en el control interno de las pesqueras. La incorporación de la cuantificación de los ácidos EPA y DHA no solo ampliará las capacidades analíticas del laboratorio, sino que también mejorará los procesos de control interno en la industria pesquera (Pinto Molina, 2015).

En términos económicos, este proyecto evaluará la viabilidad financiera de la implementación del nuevo método analítico. Se analizarán aspectos como los costos asociados a reactivos y equipos, el flujo de caja, el valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR). Este enfoque busca garantizar la sostenibilidad económica del proyecto y aprovechar las oportunidades comerciales que este mercado en crecimiento puede ofrecer (CCMAS, 2021).

Finalmente, el proyecto se desarrollará siguiendo las normativas nacionales e internacionales que rigen el uso de la cromatografía de gases en laboratorios, asegurando

el cumplimiento de los estándares de calidad establecidos para la industria alimentaria (Andrea Villalpando, 2019).

En síntesis, este trabajo evaluará la viabilidad técnica, económica y normativa de implementar un método analítico para la cuantificación de DHA y EPA en aceite de pescado. Su éxito fortalecerá los controles internos de calidad en la industria del aceite de pescado y posicionará al laboratorio como un actor destacado en este sector estratégico

1.1. **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la factibilidad técnica y económica de implementar un método analítico por cromatografía de gases para cuantificar ácidos grasos esenciales **EPA y DHA** en aceite de pescado, orientado al control interno de las pesqueras y garantizando su confiabilidad y sostenibilidad en la industria.

1.2. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar protocolos analíticos y de validación para la cuantificación de los ácidos grasos EPA y DHA mediante cromatografía de gases, asegurando la precisión, reproducibilidad y cumplimiento de las normativas vigentes.
- Optimizar el diseño del análisis cromatográfico mediante la selección de reactivos, equipos y parámetros operativos, garantizando eficiencia técnica y cumplimiento normativo en la industria pesquera.
- Realizar un inventario y evaluar los costos asociados a la implementación del método analítico, considerando el flujo de caja, los recursos disponibles, el Valor Actual Neto (VAN) y la Tasa Interna de Retorno (TIR), para garantizar la viabilidad económica.

1.3. **JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

El laboratorio químico tiene como función principal realizar controles internos para la industria pesquera. Sin embargo, en los últimos años, la actividad del laboratorio ha disminuido de forma significativa, lo que se refleja en la reducción del número de análisis realizados (ver Fig. 1). Esta situación plantea la necesidad de diversificar los servicios ofrecidos con el objetivo de garantizar la sostenibilidad financiera y aumentar su relevancia en el sector.

Por otro lado, el aceite de pescado ha adquirido una creciente importancia en Chile debido a su alto contenido de ácidos grasos esenciales omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Estos compuestos son reconocidos por sus beneficios en la salud humana y animal, incluyendo la prevención de enfermedades cardiovasculares y su impacto en el desarrollo neuronal (Calder, 2015). La FAO (2021) destaca que la demanda de productos derivados del aceite de pescado continúa creciendo tanto en mercados nacionales como internacionales, lo que incrementa la necesidad de contar con métodos analíticos confiables que garanticen la calidad de estos productos.

En este contexto, la industria pesquera requiere métodos analíticos robustos y precisos que permitan responder a las exigencias del mercado. La cromatografía de gases se ha consolidado como una técnica eficiente para la determinación de ácidos grasos en aceites marinos (Christie, 1993). Estudios recientes, como el de García Peña et al. (2016), han demostrado su eficacia en la cuantificación de EPA y DHA, subrayando la importancia de procesos previos como la esterificación para optimizar la volatilidad de los ácidos grasos y obtener resultados confiables. Además, cotizaciones actuales (Cromtek SpA, 2024) confirman la factibilidad técnica y económica de incorporar un cromatógrafo de gases de última generación, como el TRACE 1600, diseñado para este tipo de análisis.

A diferencia de los laboratorios comerciales, el laboratorio químico no compete directamente en el mercado, sino que se enfoca en ofrecer soluciones en sus controles internos para la industria pesquera. La incorporación de un análisis específico para la cuantificación de EPA y DHA permitirá fortalecer el control interno en las pesqueras, asegurando la calidad de sus productos y respaldando procesos más eficientes. Este esfuerzo consolidará la posición estratégica del laboratorio como un socio confiable en el sector.

Además, la implementación del método analítico fortalecerá el portafolio de servicios del laboratorio y permitirá aprovechar la creciente demanda en áreas específicas como la alimentación de peces, donde los ácidos grasos esenciales son críticos para su desarrollo (FAO, 2021). Este proyecto también se desarrollará en conformidad con normativas internacionales, como las establecidas por la AOAC (1991), la ISO 5725-2 (2019) y la guía nacional de validación de métodos analíticos de SERNAPESCA (2018), garantizando así la calidad de los resultados y aumentando la confianza en los servicios ofrecidos.

En síntesis, este proyecto busca diversificar y fortalecer las capacidades del laboratorio mediante la implementación de un método analítico para la cuantificación de EPA y DHA. Este avance no solo permitirá enfrentar los desafíos derivados de la disminución de actividad, sino que también abrirá nuevas oportunidades para posicionar al laboratorio como un referente en el análisis de calidad en la industria pesquera y acuícola.

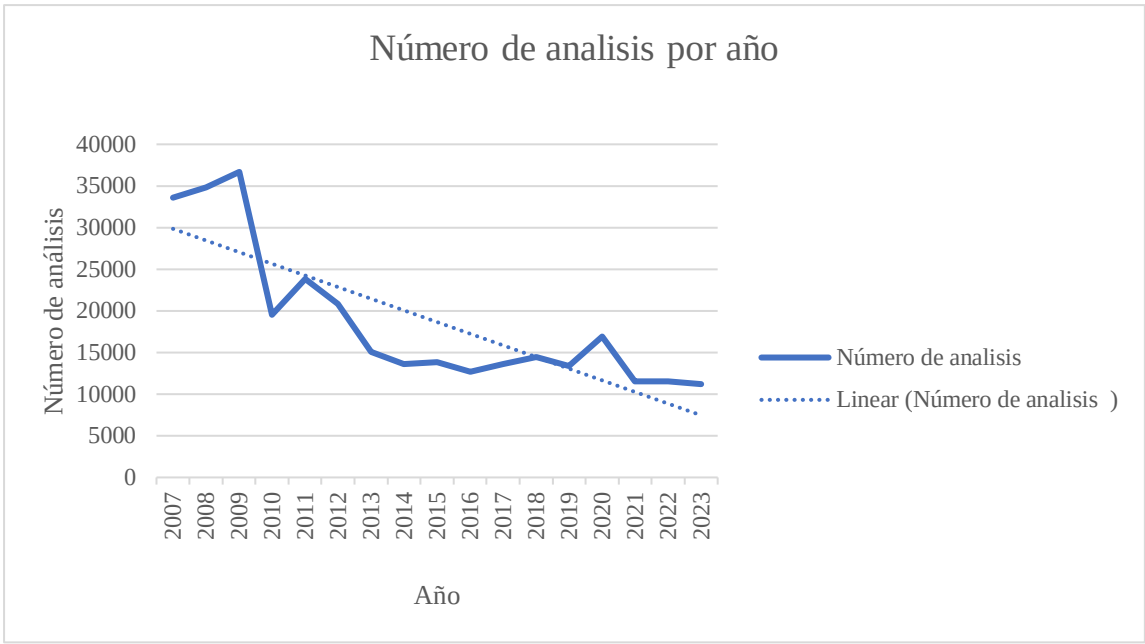


Fig. 1-1. Número de análisis por año.

1.4. METODOLOGÍA

1.4.1. Preparación de la Muestra

1.4.2. Esterificación

La muestra de aceite de pescado se preparará mediante esterificación para convertir los ácidos grasos presentes en ésteres metílicos (FAME), volátiles y aptos para análisis cromatográfico. Este paso asegura que los compuestos analizados representen fielmente la composición original del aceite (AOAC, 1991; Christie, 1993).

1.4.3. Condiciones de Esterificación

Catalizador: BF_3 en metanol al 14%.

Temperatura de reacción: 60-70°C.

Tiempo de reacción: 15 minutos.

Volumen de reactivo: 1 ml de BF_3 por cada 100 mg de muestra.

1.4.4. Análisis Cromatográfico

1.4.5. Equipo Utilizado

Se empleará un cromatógrafo TRACE 1600 con detector FID y las siguientes condiciones operativas:

Gas de arrastre: Hidrógeno.

Gases auxiliares: Aire y nitrógeno.

Temperatura del inyector: 250°C.

Rango de temperatura: Inicial a 50°C, incremento de 10°C/min hasta 240°C.

Columna: Capilar RTX- 2330, 60m x 0.25 mm ID; 0.20µm Thermo Fisher

Protocolo de Validación del Método

El protocolo de validación sigue los lineamientos de la Guía de Validación de Métodos Analíticos de SERNAPESCA y las normativas internacionales (ISO 5725-2, AOAC 991.39). Se evaluarán los siguientes parámetros:

1.4.6. Parámetros de Validación

- Linealidad: Determinada mediante la construcción de curvas de calibración usando estándares certificados de EPA y DHA. El coeficiente de correlación (R^2) deberá ser ≥ 0.99 .
- Precisión: Evaluación intra-laboratorio con replicados en tres niveles de concentración (baja, media y alta). Se espera un coeficiente de variación (CV) $< 5\%$.
- Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ): Calculados como 3.3 y 10 veces el ruido de fondo, respectivamente.
- Especificidad: Confirmación de que el método permite diferenciar EPA y DHA de otros compuestos presentes en la matriz del aceite.
- Reproducibilidad: Ensayos realizados en días diferentes y por analistas distintos.

1.4.7. Documentación del Protocolo

El protocolo incluirá:

- a) Descripción del método: Procedimiento detallado de preparación de muestras y condiciones cromatográficas.
- b) Criterios de aceptación: Valores esperados para cada parámetro de validación.
- c) Resultados de validación: Tablas con datos obtenidos y análisis estadístico de los mismos.

1.4.8. Estudio de Costos y Análisis del Flujo de Caja

El análisis económico se integrará para evaluar la factibilidad financiera, con un enfoque especial en el flujo de caja.

1.4.9. Identificación de Costos

Costos de Equipos: Cromatógrafo TRACE 1600, columnas, y accesorios (Thermo Fisher Scientific, 2024).

Costos de Reactivos: BF_3 en metanol, estándares de EPA y DHA, y gases auxiliares (hidrógeno, aire y nitrógeno).

Costos Operativos: Insumos de laboratorio, mantenimiento del equipo, y recursos humanos.

1.4.10. Proyecciones de Ingresos

Se realizarán proyecciones basadas en diferentes volúmenes de muestras:

Escenario pesimista: 5 muestras/semana.

Escenario moderado: 10 muestras/semana.

Escenario optimista: 15 muestras/semana.

1.4.11. Análisis del Flujo de Caja

El flujo de caja será calculado considerando:

Ingresos mensuales: Basados en el número de muestras analizadas y el precio por análisis.

Egresos mensuales: Incluyendo costos operativos y amortización de la inversión inicial.

Indicadores financieros:

Valor actual neto (VAN): Evalúa la rentabilidad de un proyecto de inversión.

Tasa interna de retorno (TIR): Es una medida de rentabilidad que se utiliza para evaluar la viabilidad de un proyecto de inversión.

Resultados Económicos

Se calcularán los siguientes indicadores:

- Flujo de caja mensual neto: Ingresos menos egresos.
- VAN anual promedio: 25-30%, dependiendo del escenario.
- TIR: Entre 1 y 2 años según el volumen de muestras.

1.5. DESARROLLO

El desarrollo del presente proyecto se centra en la implementación de un método analítico para la cuantificación de los ácidos grasos esenciales EPA y DHA en aceite de pescado mediante cromatografía de gases. Este proceso incluye tanto aspectos técnicos como económicos, siguiendo una metodología diseñada y alineada con normativas nacionales e internacionales.

El proyecto se dividió en cuatro etapas principales: preparación de las muestras mediante esterificación, análisis cromatográfico, protocolo de validación del método analítico y evaluación económica. Cada etapa garantiza la precisión, reproducibilidad y viabilidad económica del método, asegurando que este cumpla con los estándares requeridos por la industria pesquera y las normativas aplicables.

Además, el análisis económico incluye un estudio detallado del flujo de caja, valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR), con el objetivo de evaluar la sostenibilidad financiera del método en escenarios de operación proyectados.

En esta sección se presentan los procedimientos implementados, los resultados obtenidos en cada etapa del proyecto y una discusión sobre su impacto técnico, económico y normativo. Este desarrollo permite evidenciar la factibilidad general del método propuesto y su potencial contribución al fortalecimiento de los controles internos de la industria pesquera.

1.6. CONCLUSIÓN DEL CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El Capítulo 1 del presente proyecto introduce la evaluación de la factibilidad para implementar un método analítico destinado a la cuantificación de los ácidos grasos esenciales EPA y DHA en el aceite de pescado, utilizando cromatografía de gases (GC). Este análisis es crucial en la industria pesquera debido al aumento de la demanda de estos ácidos grasos por sus beneficios para la salud y el creciente mercado de productos alimenticios y farmacéuticos derivados del aceite de pescado.

El objetivo general del proyecto es determinar si este método analítico cumple con los requisitos técnicos, económicos y normativos, asegurando su viabilidad en el control interno de calidad para las pesqueras. Para lograr esto, se han planteado objetivos específicos como el desarrollo de protocolos de metodología analítica y validación del método, la optimización de las condiciones cromatográficas y el análisis detallado de los costos asociados con la implementación del método.

La justificación del proyecto se basa en la necesidad de diversificar los servicios ofrecidos por el laboratorio químico, especialmente ante la disminución de actividad que enfrenta el laboratorio debido a una reducción en el número de análisis. Este proyecto permitirá fortalecer la sostenibilidad financiera del laboratorio y responder a las exigencias del mercado, contribuyendo a mejorar la calidad del aceite de pescado mediante un método confiable y preciso.

Este primer capítulo establece, por tanto, las bases del proyecto, articulando tanto la relevancia técnica como la viabilidad económica y la alineación con las normativas internacionales, lo que asegura que el laboratorio se posiciona como un actor relevante en la industria pesquera y de aceites.

CAPÍTULO 2. PROTOCOLO DEL METODO ANALITICO

2.1. INTRODUCCIÓN

Entre las técnicas analíticas disponibles, la cromatografía de gases (GC) se posiciona como el método de referencia para la determinación de ácidos grasos en aceites, debido a su alta resolución, precisión y capacidad para separar compuestos similares. Esta técnica permite identificar y cuantificar los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés), obtenidos a través de un proceso de derivatización conocido como esterificación (Christie, 1993; AOAC, 1991).

La esterificación es un paso fundamental que convierte los ácidos grasos libres presentes en el aceite en ésteres metílicos más volátiles y estables, adecuados para el análisis cromatográfico. Este proceso utiliza metanol como alcohol y BF_3 como catalizador químico, asegurando una conversión eficiente sin degradar los ácidos grasos poliinsaturados, incluso bajo condiciones controladas (Felizardo & Correia, 2007).

Normativas internacionales aceptadas en Chile como la AOAC 991.39 y la AOCS Ce 1b-89, ofrecen lineamientos detallados sobre la preparación de muestras, las condiciones cromatográficas y los parámetros para la validación del método. Estas normativas son ampliamente adoptadas en la industria para garantizar resultados reproducibles y confiables. A nivel nacional, la guía de validación de métodos analíticos de SERNAPESCA (2018) proporciona directrices específicas para el contexto chileno, asegurando el cumplimiento de estándares en productos pesqueros.

El protocolo aquí presentado tiene como objetivo implementar un método analítico robusto y validado para la cuantificación de EPA y DHA en aceites marinos. La metodología propuesta adapta los principios de las normativas nacionales e internacionales a las características y necesidades del laboratorio, optimizando tanto el proceso de esterificación como las condiciones cromatográficas. Este enfoque asegura la precisión y exactitud de los resultados, contribuyendo al fortalecimiento del control de calidad en la industria pesquera y posicionando al laboratorio como un referente en análisis químicos de alta especialización.

2.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES

2.2.1. Introducción a la Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica ampliamente utilizada para la separación y análisis de compuestos volátiles y semivolátiles. Su principio se basa en la partición diferencial de los analitos entre una fase móvil (un gas) y una fase estacionaria (recubrimiento en una columna capilar). Es especialmente útil en la industria alimentaria y farmacéutica debido a su alta resolución, sensibilidad y precisión (Christie, 1993).

En el caso de los ácidos grasos, como el EPA y el DHA, la GC es la técnica de referencia para su cuantificación debido a la necesidad de separar estos compuestos de otros ácidos grasos presentes en matrices complejas como el aceite de pescado (AOAC, 1991).

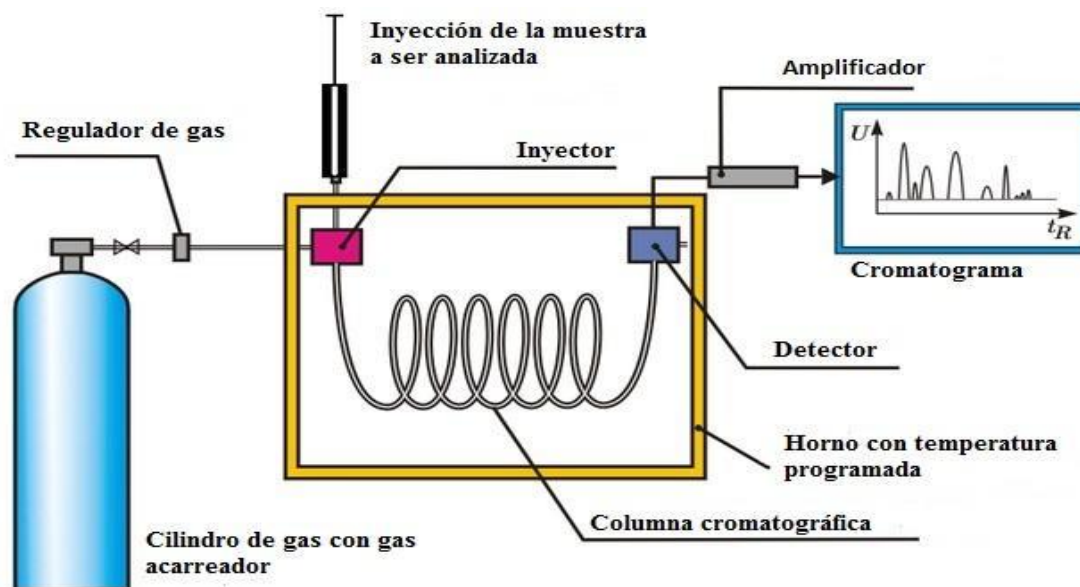


Fig. 2-1. Esquema de un cromatógrafo de gases. Disponible en: <https://www.lifeder.com/cromatografia-de-gases/>. Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.

A continuación, se describen sus componentes principales:

2.2.2. Fuente de Gas Portador

Suministra un gas inerte, como hidrogeno o nitrógeno, que actúa como fase móvil transportando la muestra a través del sistema, para el caso de la metodología usada en el protocolo el gas portador es el **hidrogeno**.

La elección del gas portador es una decisión fundamental en la cromatografía de gases, ya que influye directamente en la eficiencia, resolución y costos del análisis. Los gases más comunes utilizados como portadores son el **hidrógeno**, el **helio** y el **nitrógeno**, cada uno con características específicas que los hacen más o menos adecuados dependiendo de la aplicación analítica.

Para el análisis de ácidos grasos esenciales como EPA y DHA en aceites marinos, el **hidrógeno** destaca como la mejor opción debido a su alta **eficiencia de separación**, **menor costo operativo** y **compatibilidad con el detector de ionización de llama (FID)** utilizado en este proyecto. Aunque el helio también ofrece alta resolución, su disponibilidad limitada y alto costo lo hacen menos viable. Por otro lado, el nitrógeno, aunque económico y seguro, presenta menor eficiencia y tiempos de análisis más prolongados, lo que lo hace menos competitivo para este tipo de análisis. (**Ver Tabla 1**)

Característica	Hidrógeno (H ₂)	Nitrógeno (N ₂)	Helio (He)
Costo	Bajo (puede generarse localmente).	Bajo (ampliamente disponible).	Alto (costoso y de disponibilidad limitada).
Velocidad de flujo óptima	Alta, permite análisis rápidos.	Baja, requiere más tiempo de análisis.	Moderada, similar al hidrógeno, pero más caro.
Eficiencia de separación	Alta, excelente para resoluciones complejas.	Moderada, puede ser insuficiente para algunos compuestos.	Alta, comparable al hidrógeno.
Compatibilidad con detectores	Compatible con FID como gas portador y combustible.	Compatible con la mayoría de los detectores.	Compatible con la mayoría de los detectores.
Disponibilidad	Muy alta, puede generarse in situ.	Muy alta, ampliamente disponible.	Limitada, depende de importaciones.
Seguridad	Inflamable, requiere medidas de seguridad estrictas.	Seguro, no inflamable.	Seguro, no inflamable.
Sostenibilidad	Alta, puede producirse por electrólisis del agua.	Moderada, requiere extracción industrial	Baja, recurso finito.
Aplicaciones ideales	Análisis rápidos y precisos con alta resolución.	Bajo costo en análisis simples y menos exigentes.	Análisis de alta precisión donde el costo no es una limitante.

Tabla 2-1. Comparación de gases portadores para cromatografía de gases

2.2.3. Justificación Técnica del Uso de Hidrógeno

2.2.3.1. Velocidad y Eficiencia de Separación

El hidrógeno tiene la menor viscosidad entre los gases portadores comunes, lo que permite una velocidad de flujo más alta sin perder resolución en la separación cromatográfica. Esto significa que los tiempos de análisis pueden ser más cortos, mejorando la eficiencia del análisis.

Según el principio de Van Deemter, el hidrógeno proporciona la mejor relación entre velocidad de flujo y eficiencia de separación, especialmente para columnas capilares de alta resolución (McNair & Miller, 2011).

2.2.3.2. Resolución y Sensibilidad

En comparación con el nitrógeno, el hidrógeno ofrece una **mayor resolución de los picos cromatográficos**. Esto es crucial para diferenciar entre EPA y DHA y otros ácidos grasos presentes en el aceite de pescado. Aunque el helio también tiene buena resolución, el hidrógeno ofrece características similares a un **costo significativamente menor**.

2.2.3.3. Compatibilidad con el Detector de Ionización de Llama (FID)

El hidrógeno es tanto un gas portador como un combustible para la llama del FID. Esto elimina la necesidad de un suministro de helio separado, simplificando la configuración del equipo y reduciendo los costos operativos (Christie, 1993)

2.2.4. Ventajas económicas

2.2.4.1. Disponibilidad y Costo

El helio, aunque es altamente eficiente, es costoso y su disponibilidad global está limitada, lo que genera fluctuaciones de precios y problemas de suministro. El hidrógeno, por otro lado, es más económico y puede producirse en el laboratorio mediante generadores de hidrógeno.

Según estimaciones recientes, el uso de hidrógeno puede reducir hasta un 50% los costos operativos asociados al gas portador en GC.

2.2.4.2. Sostenibilidad

El hidrógeno es más sostenible porque puede generarse localmente a partir del agua mediante electrólisis, lo que reduce la dependencia de gases comprimidos externos.

2.2.5. Comparación con el Nitrógeno

Aunque el nitrógeno es económico y ampliamente disponible, su menor eficiencia a altas velocidades de flujo lo hace menos ideal para análisis rápidos y detallados como la cuantificación de EPA y DHA.

Además, el uso de nitrógeno puede prolongar los tiempos de análisis, aumentando el tiempo requerido por muestra y, en consecuencia, los costos laborales.

2.2.6. Seguridad y Precauciones

Una preocupación común con el uso de hidrógeno es su inflamabilidad. Sin embargo, los sistemas modernos de cromatografía están equipados con sensores de detección de fugas y sistemas de apagado automático para garantizar la seguridad.

2.2.7. Impacto en el Proyecto

El uso de hidrógeno como gas portador en lugar de helio o nitrógeno se alinea con los objetivos del proyecto debido a:

- Reducción de costos operativos: Optimización de los recursos del laboratorio.

- Mejor rendimiento analítico: Obtención de resultados precisos y reproducibles en menos tiempo.
- Compatibilidad técnica: Maximización del desempeño del equipo TRACE 1600 y del detector FID utilizado en el protocolo.

El hidrógeno no solo optimiza los tiempos de análisis y la resolución cromatográfica, sino que también es una opción sostenible al poder generarse localmente mediante sistemas de electrólisis. Sin embargo, su uso requiere medidas de seguridad estrictas debido a su naturaleza inflamable, esta elección refuerza el enfoque técnico y económico del proyecto, asegurando resultados precisos, confiables y alineados con los estándares nacionales e internacionales.

2.2.8. Sistema de Inyección:

Introduce la muestra en el flujo del gas portador. Generalmente, se utiliza una jeringa o un Autosampler para inyectar la muestra líquida en un puerto de inyección calentado, donde se volatiliza rápidamente, para este proyecto se usará un Autosampler.

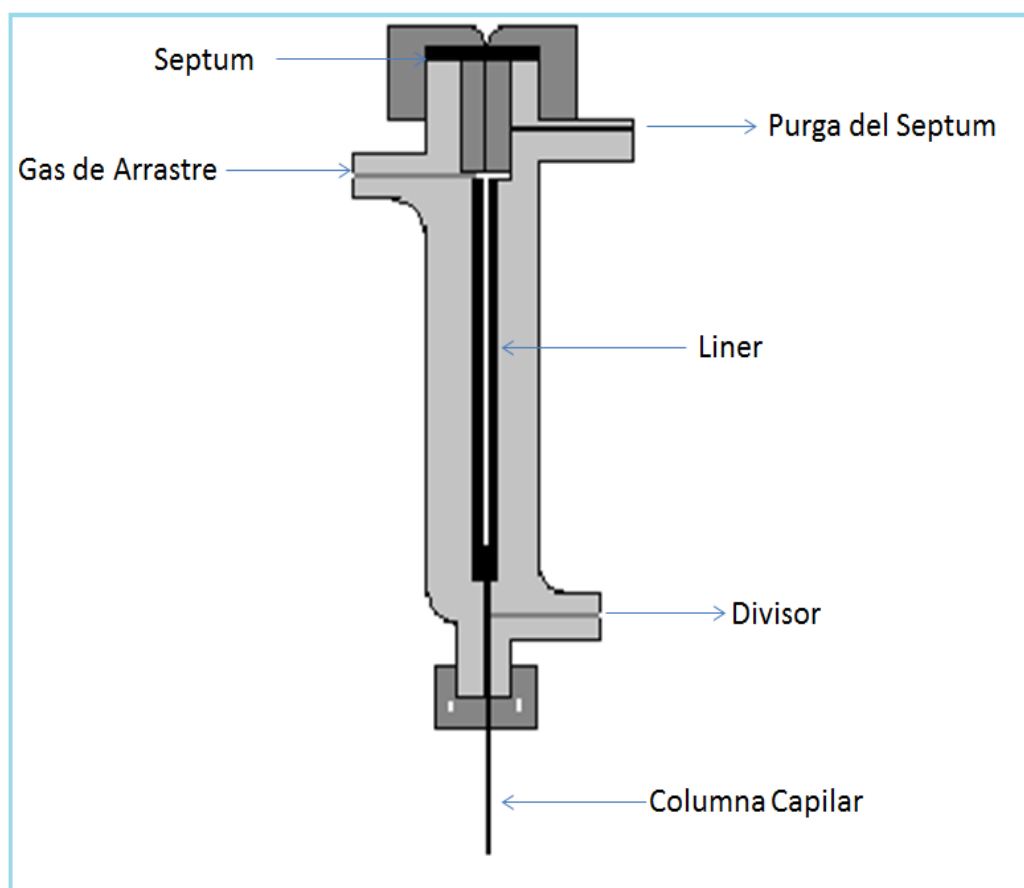


Fig. 2-2. Inyector Split/Splitless. La válvula del divisor está siempre abierta en el modo Split, en el modo Splitless está inicialmente cerrada y después de un tiempo se abre. El protocolo de análisis se usa un inyector Splitless. Disponible en <http://gcailin.blogspot.com/2013/12/cromatografia-que-es-cromatografia.html> //. Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.

2.2.9. Justificación del Uso de Inyector Splitless

2.2.9.1. Diferencias Fundamentales entre Split y Splitless

a) Inyector Split

Principio: Una porción significativa de la muestra se desvía (o "divide") hacia el desecho y solo una pequeña parte ingresa a la columna.

Ventajas:

- Ideal para análisis rápidos y compuestos en altas concentraciones.
- Reduce la sobrecarga de la columna

Limitaciones:

- Disminuye la sensibilidad porque solo una fracción de la muestra llega a la columna.
- Menos adecuado para compuestos en concentraciones bajas, como EPA y DHA en aceites (McNair & Miller, 2011).

b) Inyector Splitless

Principio: Toda la muestra inyectada se introduce en la columna, maximizando la transferencia de analitos al sistema.

Ventajas:

- Mayor sensibilidad, ideal para detectar compuestos en bajas concentraciones.
- Permite analizar compuestos termolábiles o de difícil detección (Christie, 1993).

Limitaciones:

- a) Requiere mayor cuidado en la preparación de la muestra para evitar contaminaciones o interferencias (AOCS, 2005).

2.2.9.2. Justificación Técnica del Uso de Inyector Splitless

a) Alta Sensibilidad

En el análisis de EPA y DHA, que pueden estar presentes en bajas concentraciones en aceites de pescado, es crucial maximizar la cantidad de muestra que llega a la columna. El inyector Splitless permite esto al no dividir la muestra (McNair & Miller, 2011).

b) Reproducción de Análisis Normativos

Métodos como AOAC 991.39 y AOCS Ce 1b-89 recomiendan configuraciones Splitless para la determinación precisa de ácidos grasos esenciales, debido a su sensibilidad superior y menor pérdida de analitos durante la inyección (AOAC, 1991; AOCS, 2005).

c) Compatibilidad con Cromatografía de Alta Resolución

El uso de columnas capilares de pequeño diámetro en GC requiere un volumen de muestra limitado. El modo Splitless asegura que todo el volumen inyectado sea aprovechado, maximizando la señal en el detector FID (Christie, 1993).

Característica	Split	Splitless
Sensibilidad	Baja (solo una fracción de la muestra se analiza).	Alta (toda la muestra entra en la columna).
Concentración de Analitos	Adecuado para analitos en altas concentraciones.	Ideal para analitos en bajas concentraciones.
Preparación de la Muestra	Menos exigente, puede tolerar interferencias menores.	Requiere mayor pureza en la muestra.
Aplicaciones Típicas	Análisis rápidos y compuestos mayoritarios.	Análisis de trazas o compuestos minoritarios.
Riesgo de Sobrecarga de la Columna	Bajo.	Moderado, requiere control del volumen inyectado.

Tabla 2-2. Comparación entre Modos Split y Splitless.

2.2.9.3. Impacto en el Proyecto

El inyector Splitless es más adecuado para este protocolo debido a:

- Sensibilidad requerida: El análisis de EPA y DHA exige detectar compuestos en concentraciones bajas con alta precisión (McNair & Miller, 2011).
- Compatibilidad con Normativas: Los métodos analíticos internacionales que guían este proyecto validan configuraciones Splitless para garantizar resultados reproducibles y confiables (AOAC, 1991; AOCS, 2005).
- Eficiencia de Transferencia de Muestra: Permite que toda la cantidad inyectada sea aprovechada, maximizando la señal y minimizando el error analítico (Christie, 1993).

2.2.10. Columna Cromatográfica

Es el corazón del GC, donde ocurre la separación de los componentes de la muestra. Puede ser una columna empacada o capilar, recubierta con una fase estacionaria específica que interactúa diferencialmente con los analitos. Para el caso del protocolo de análisis se usa una columna capilar. Ver Fig.4

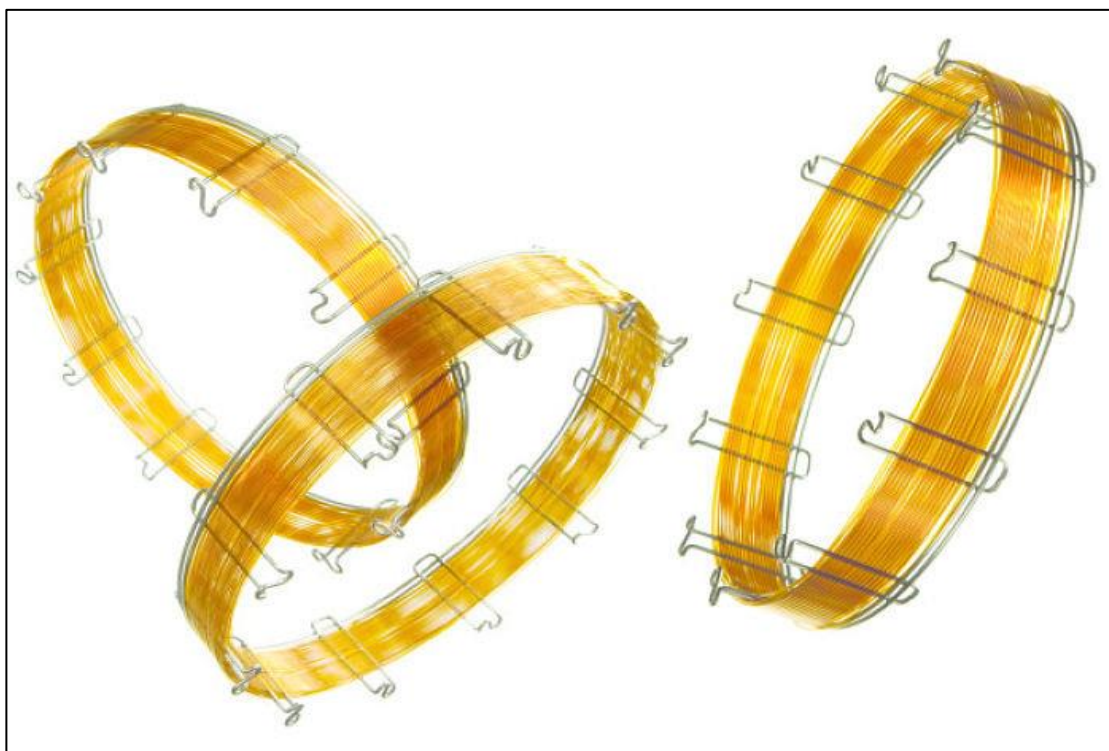


Fig. 2-3. Columnas capilares. Disponible en: <https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/11/cromatografia-de-gases.html>. Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.

2.2.10.1. Justificación de la Elección de Columna Capilar

a) Diferencias Técnicas Entre Columnas Capilares y Empacadas

Columna Capilar:

- Está compuesta por un tubo de sílice fundida con un diámetro interno muy pequeño (0,1–0,53 mm) y una longitud mucho mayor (15–100 m).
- Revestida con una fase estacionaria líquida aplicada uniformemente a las paredes internas, lo que permite interacciones específicas con los analitos.
- Diseñada para separar compuestos complejos con alta resolución y eficiencia.

Columna Empacada:

- Consiste en un tubo metálico o de vidrio relleno con partículas sólidas recubiertas con la fase estacionaria.
- Generalmente más corta (1–5 m) y con un diámetro mayor (2–4 mm).
- Adecuada para análisis simples, pero limitada en la separación de compuestos estructuralmente similares.

2.2.10.2. Ventajas de las Columnas Capilares en el Contexto del Proyecto

- Alta Resolución:

Las columnas capilares ofrecen una mayor eficiencia de separación gracias a su longitud y menor diámetro interno. Esto es esencial para diferenciar EPA y DHA de otros ácidos grasos presentes en el aceite de pescado (Christie, 1993).

- Mayor Sensibilidad:

La menor dispersión de los analitos dentro de la columna capilar resulta en picos más definidos en el cromatograma, mejorando la detección de compuestos en bajas concentraciones (AOCS, 2005).

- Compatibilidad con Equipos Modernos:

Los sistemas de cromatografía de gases actuales, como el TRACE 1600, están optimizados para el uso de columnas capilares, lo que garantiza un rendimiento superior.

- Reducción de Consumo de Gas Portador:

El diseño capilar requiere un menor flujo de gas portador, reduciendo los costos operativos en comparación con columnas empacadas

2.2.10.3. Limitaciones de las Columnas Empacadas

- Resolución Inferior:

Las columnas empacadas no separan eficientemente compuestos estructuralmente similares, lo que puede resultar en solapamiento de picos en el cromatograma.

- Mayor Tiempo de Análisis:

Su menor eficiencia puede requerir análisis más largos para obtener resultados comparables.

- Compatibilidad Limitada:

Están diseñadas principalmente para detectores menos sensibles y no son ideales para aplicaciones de alta precisión, como el análisis de ácidos grasos poliinsaturados

2.2.10.4. Impacto en el Proyecto

El uso de una columna capilar optimiza la precisión y reproducibilidad del análisis, lo que es fundamental para el cumplimiento de normativas internacionales como AOAC 991.39 y AOCS Ce 1b-89. Además, permite que el protocolo propuesto cumpla con las expectativas de la industria pesquera, donde la calidad y confiabilidad del análisis son críticas.

Característica	Columna Capilar	Columna Empacada
Longitud	15–100 m	1–5 m
Diámetro Interno	0,1–0,53 mm	2–4 mm
Eficiencia de Separación	Alta, ideal para compuestos complejos	Baja, limitada para compuestos similares
Consumo de Gas Portador	Bajo	Alto
Tiempo de Análisis	Corto	Largo
Compatibilidad con Normativas	Excelente (e.g., AOAC, AOCS)	Limitada

Tabla 2-3. Comparación entre columnas capilares y empacadas.

La elección de una columna capilar en este protocolo analítico es fundamental para garantizar la separación y detección precisa de EPA y DHA, alineándose con los requerimientos técnicos, normativos y de costos del proyecto.

2.2.11. Horno

Aloja la columna y controla su temperatura. El control preciso de la temperatura es crucial para lograr una separación eficiente y reproducible.

2.2.11.1. El Horno en la Cromatografía de Gases y su Relevancia

El horno en un cromatógrafo de gases es un componente esencial que controla la temperatura de la columna cromatográfica. Su función principal es proporcionar un entorno térmico estable y programable para garantizar la volatilización de los analitos y facilitar su separación basada en las interacciones con la fase estacionaria (McNair & Miller, 2011; Lambert, 2018). En el caso del análisis de ácidos grasos como EPA y DHA, la temperatura del horno influye directamente en la calidad de la separación cromatográfica, ya que estos compuestos tienen puntos de ebullición relativamente altos y propiedades térmicas únicas (Christie, 1993).

Relevancia:

- Garantizar la volatilización de los analitos. (van Deemter, 1956).
- Facilitar su separación basada en las interacciones con la fase estacionaria. (McNair & Miller, 2011).

2.2.11.2. Importancia del Horno en el Contexto del Proyecto

- Control Preciso de la Temperatura:

Los ácidos grasos poliinsaturados como EPA y DHA son sensibles al calor, y temperaturas excesivas pueden provocar su degradación (AOCS, 2005). El horno asegura condiciones térmicas óptimas para volatilizar los analitos sin comprometer su integridad (Zhang & Xu, 2015).

- Programación de Gradientes de Temperatura:

Un gradiente de temperatura bien diseñado permite separar eficientemente compuestos con puntos de ebullición cercanos. Esto es fundamental para la separación precisa de EPA y DHA de otros ácidos grasos en aceites marinos (AOAC, 1991).

- Reproducibilidad Analítica:

La estabilidad térmica del horno garantiza tiempos de retención consistentes entre corridas, un parámetro clave en la validación del método analítico (ISO, 2015; Skoog et al., 2017).

- Adaptación a Columnas Capilares:

Las columnas capilares utilizadas en este proyecto requieren control térmico preciso debido a su pequeño diámetro y alta sensibilidad a fluctuaciones de temperatura (Felizardo & Correia, 2007).

2.2.11.3. Parámetros Clave Asociados al Horno

- Rango de Temperatura:

Los hornos modernos alcanzan temperaturas de hasta 400 °C, adecuados para analizar compuestos con altos puntos de ebullición como los ácidos grasos (McNair & Miller, 2011).

- Velocidad de Calentamiento:

La capacidad de aumentar la temperatura a una velocidad controlada (10–20 °C/min) es crucial para evitar el solapamiento de picos en el cromatograma (AOCS, 2005).

- Estabilidad Térmica:

Una variación mínima en la temperatura (<0.1 °C) es fundamental para obtener tiempos de retención consistentes y reproducibles (ISO, 2015).

2.2.11.4. Impacto en el proyecto

El horno es particularmente importante en este proyecto porque:

- Previene la Degradación Térmica:

Asegura que los analitos poliinsaturados no sufran oxidación ni isomerización durante el análisis (Christie, 1993).

- Optimiza la Separación de Compuestos Similares:

Facilita la separación de EPA y DHA de otros ácidos grasos presentes en el aceite de pescado, garantizando picos bien definidos y resueltos (Skoog et al., 2017).

- Cumple con Normativas Internacionales:

Los métodos AOAC 991.39 y AOCS Ce 1b-89 especifican gradientes de temperatura controlados para obtener resultados analíticos válidos y reproducibles (AOAC, 1991; ISO, 2015).

Parámetro	Relevancia
Rango de Temperatura	Necesario para volatilizar completamente los analitos sin descomponerlos (ISO 12966-4, 2015).
Estabilidad Térmica	Asegura resultados reproducibles en corridas analíticas sucesivas (Skoog et al., 2014).
Gradientes Térmicos	Mejora la separación de compuestos de distinta volatilidad (McNair & Miller, 2011).

Tabla 2-4. Parámetros clave asociados al horno.

Parámetro	Horno Convencional	Horno de Alta Precisión
Rango de Temperatura	Hasta 300 °C	Hasta 400 °C
Velocidad de Calentamiento	10 °C/min	20–30 °C/min
Estabilidad Térmica	Variación ±0.5 °C	Variación <±0.1 °C
Compatibilidad con Gradientes	Limitada a perfiles simples.	Permite gradientes complejos.

Tabla 2-5. Comparación de configuraciones de horno.

2.2.12. Detector

Identifica y cuantifica los componentes separados al salir de la columna. Existen varios tipos de detectores, siendo el de ionización de llama (FID) uno de los más comunes debido a su alta sensibilidad para compuestos orgánicos.

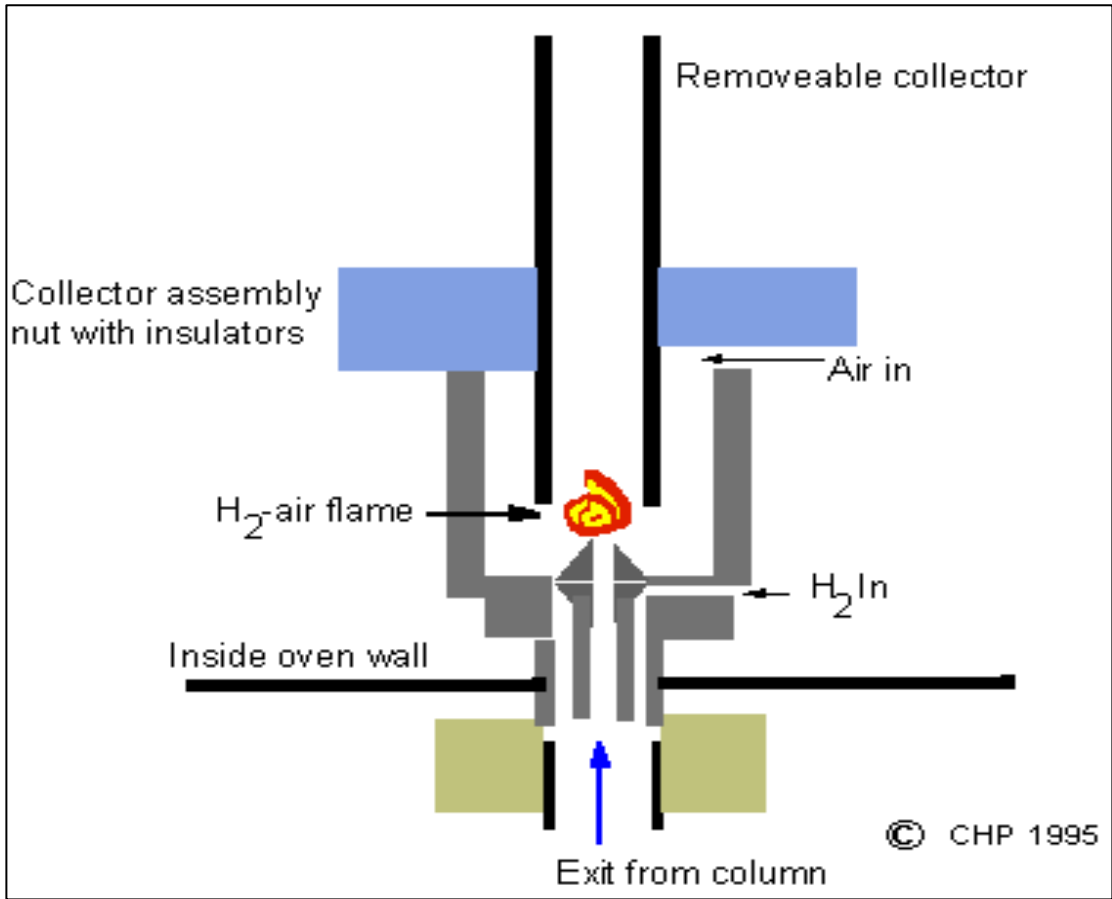


Fig. 2-4. Esquema de FID Extraído de: https://www.chemicool.com/definition/flameionization_gas_chromatography_detector_fid.html. Fecha de acceso: 21 noviembre 2024.

2.2.12.1. El Detector FID y su Papel en la Cromatografía de Gases

A. Principio de Funcionamiento del FID

El detector de ionización de llama opera mediante la combustión de los compuestos orgánicos en una flama de hidrógeno y aire. Durante la combustión:

- Los compuestos se ionizan parcialmente en la flama.
- Los iones generados son recolectados por electrodos, generando una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de compuesto presente.

- Esta señal es registrada como un pico cromatográfico, cuya área representa la concentración del analito (Skoog, Holler & Crouch, 2014).

El FID es particularmente útil para la detección de compuestos que contienen carbono e hidrógeno, como los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES), lo que lo hace ideal para este proyecto (Christie, 1993; McNair & Miller, 2011).

B. Ventajas del FID en el Análisis de EPA y DHA

➤ Alta Sensibilidad:

- El FID tiene límites de detección en el rango de picogramos, adecuado para analizar EPA y DHA, que pueden estar presentes en concentraciones bajas en aceites de pescado (AOAC, 1991).
- Su sensibilidad lo hace ideal para estudios en los que se requiere precisión en matrices complejas como los aceites marinos (Christie, 1993).
- Linealidad Amplia:

El detector tiene una respuesta lineal en un rango amplio de concentraciones, permitiendo medir tanto trazas como compuestos en mayores cantidades sin pérdida de precisión (McNair & Miller, 2011; Cárdenas et al., 2010).

- Especificidad para Compuestos Orgánicos:

Responde de manera selectiva a compuestos orgánicos y es insensible al agua, nitrógeno o dióxido de carbono, lo que minimiza interferencias durante el análisis (Holčapek et al., 2005; Pavía et al., 2014).

- Compatibilidad con Columnas Capilares:

Diseñado para trabajar con columnas capilares, el FID maximiza la resolución y eficiencia de separación, características críticas para identificar EPA y DHA (ISO 12966-4, 2015).

C. Parámetros Clave del FID en el Proyecto

- Gas Combustible (Hidrógeno):

Utiliza hidrógeno como fuente de combustible, que es parte integral del sistema de gases requeridos para el protocolo analítico (McNair & Miller, 2011).

- Gas Oxidante (Aire):

El aire comprimido permite la formación de una llama estable, facilitando la ionización de los compuestos orgánicos (Christie, 1993).

- Compatibilidad con FAMES:

Los FAMES generados tras la esterificación de los ácidos grasos son ideales para análisis con FID debido a su buena volatilidad y alta respuesta en el detector (Skoog et al., 2014; ISO 12966-4, 2015).

Parámetro	FID	Detector de Captura de Electrones (ECD)	Espectrometría de Masas (MS)
Sensibilidad para Compuestos Orgánicos	Alta	Baja	Alta
Compatibilidad con FAMES	Excelente	Limitada	Excelente
Costo Operativo	Bajo	Moderado	Alto
Complejidad de Operación	Baja	Moderada	Alta
Rango Lineal	Amplio	Limitado	Amplio

Tabla 2-6. Comparación con otros detectores

2.2.12.2. Impacto del FID en el Proyecto

- Cuantificación Precisa:

Permite medir con exactitud las concentraciones de EPA y DHA, garantizando resultados reproducibles, incluso a niveles de trazas (AOAC, 1991; Zhang et al., 2015).

- Validación del Método Analítico:

El FID contribuye a parámetros críticos de validación como la linealidad, límites de detección y precisión (ISO 12966-4, 2015; McNair & Miller, 2011).

- Cumplimiento Normativo:

Métodos como AOAC 991.39 y AOCS Ce 1b-89 aceptados en Chile establecen el FID como el detector de elección para el análisis de FAMES en aceites y grasas (AOCS, 2005).

2.2.13. Sistema de Registro de Datos

Recoge y procesa las señales del detector, generando cromatogramas que representan la separación de los componentes de la muestra.

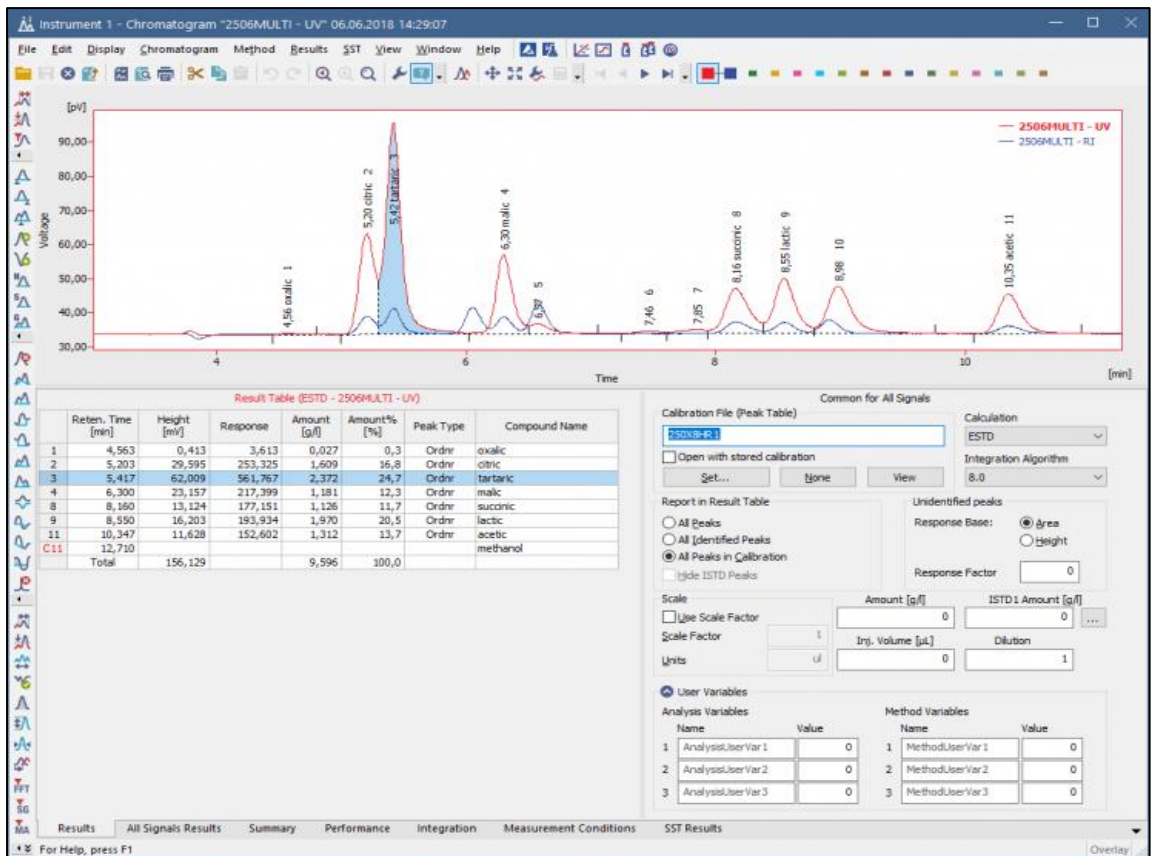


Fig. 2-5. Software para cromatografía de gases. Extraído de: <https://www.agsanalitica.com/es/producto/Clarity>. Fecha de acceso: 09 de diciembre de 2024.

2.3. VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

La elección de la GC para la cuantificación de EPA y DHA se justifica por sus múltiples ventajas:

- Alta Resolución:** La GC permite la separación eficiente de compuestos estructuralmente similares, como los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Esto es crucial para diferenciar entre EPA, DHA y otros ácidos grasos presentes en el aceite de pescado (AOCS, 2005).
- Sensibilidad:** Los detectores acoplados a GC, como el detector de ionización de llama (FID), ofrecen una alta sensibilidad para los compuestos orgánicos. Esto asegura la detección de concentraciones muy bajas de EPA y DHA en muestras complejas.
- Compatibilidad con Métodos de Esterificación:** La GC es altamente compatible con la forma derivatizada de los ácidos grasos (ésteres metílicos), que son más volátiles y estables que los ácidos grasos libres (Felizardo & Correia, 2007).
- Estándares Reconocidos:** Métodos estandarizados como AOAC 991.39 y AOCS Ce 1b-89 recomiendan el uso de GC para la determinación de ácidos grasos en aceites marinos, lo que refuerza su validez y aceptación en la industria (AOAC, 1991; AOCS, 2005).

2.3.1. Aplicación en el Análisis de EPA y DHA

Los ácidos grasos EPA y DHA son compuestos clave en los aceites de pescado, conocidos por sus beneficios para la salud. Sin embargo, su cuantificación presenta desafíos analíticos debido a:

2.3.2. Similitud estructural con otros ácidos grasos:

- Esto requiere una técnica con alta resolución, como la GC, para separarlos eficientemente.

A. Susceptibilidad a la oxidación:

- El análisis en GC minimiza el riesgo de degradación durante el proceso analítico, especialmente si se utilizan condiciones cuidadosamente controladas de temperatura y tiempo de análisis.

2.3.3. Comparación con Otras Técnicas Analíticas

Aunque existen otras técnicas analíticas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la GC es preferida para la cuantificación de ácidos grasos debido a:

A. Costos Relativos:

- La GC es más económica en términos de reactivos y preparación de muestras en comparación con la HPLC.

B. Normativas nacionales e Internacionales:

- La mayoría de los métodos nacionales e internacionales estandarizados para ácidos grasos recomiendan la GC, reforzando su validez en el contexto industrial (ISO 12966-4, 2015).

2.3.4. Consideraciones Técnicas

Para garantizar un análisis exitoso de EPA y DHA mediante GC, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos técnicos:

A. Selección de la Columna:

- Se recomiendan columnas capilares de fase polar para una separación óptima de ácidos grasos poliinsaturados.

B. Control de Temperatura:

- Un gradiente de temperatura bien diseñado asegura una separación completa sin afectar la estabilidad de los compuestos.

C. Gases de Trabajo:

- El hidrógeno como gas de arrastre, junto con el aire y nitrógeno para el detector, son fundamentales para el rendimiento óptimo del sistema (Cromtek SpA, 2024).

2.3.5. Relación Costo-Beneficio

Comparada con otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

- Costos Operativos Menores: Los reactivos y consumibles requeridos para GC suelen ser más económicos.
- Equipos de Alta Durabilidad: Los cromatógrafos modernos, como el TRACE 1600, están diseñados para un uso intensivo con costos de mantenimiento relativamente bajos (Cromtek SpA, 2024).

2.3.6. Impacto en la Industria Pesquera

El uso de GC permite cumplir con las demandas de precisión y especificidad de la industria pesquera, donde la calidad del aceite de pescado es crucial para su comercialización. Además, su aceptación normativa garantiza que los resultados sean reconocidos tanto a nivel nacional como internacional (SERNAPESCA, 2018).

2.3.7. Conclusión

La elección de la cromatografía de gases no solo está justificada por su precisión técnica, sino también por su capacidad para cumplir con los estándares normativos, su compatibilidad con las etapas de preparación de muestras y su rentabilidad operativa. Implementar esta técnica en el protocolo propuesto asegura que los resultados obtenidos sean confiables, reproducibles y alineados con los requerimientos de la industria.

2.4. ESTERIFICACIÓN EN EL ANÁLISIS DEL ACEITE DE PESCADO

La esterificación es un paso fundamental en el análisis de ácidos grasos presentes en el aceite de pescado, especialmente cuando se utiliza cromatografía de gases (GC) como técnica analítica. Este proceso químico convierte los ácidos grasos libres presentes en el aceite en sus correspondientes ésteres metílicos, conocidos como FAME (Ésteres metílicos de ácidos grasos). Estos compuestos son más volátiles y estables que los ácidos grasos en su forma natural, lo que los hace adecuados para su separación y detección en el cromatógrafo de gases (Christie, 1993).

En el contexto del análisis de EPA y DHA, la esterificación tiene varios objetivos clave:

- Mejorar la Volatilidad: Los ésteres metílicos poseen una volatilidad significativamente mayor que los ácidos grasos libres, lo que facilita su transporte a través de la columna capilar del cromatógrafo.
- Proteger los Ácidos Grasos Poliinsaturados: Los métodos de esterificación cuidadosamente diseñados evitan la degradación de compuestos sensibles como el EPA y el DHA, preservando su estructura molecular y garantizando resultados representativos (Felizardo & Correia, 2007).

- Estabilizar las Muestras: Los ésteres metílicos son más estables bajo las condiciones de alta temperatura que se emplean en la cromatografía de gases, reduciendo el riesgo de oxidación o transformación durante el análisis.

2.4.1. Química del Proceso

La esterificación implica una reacción entre los ácidos grasos libres y un alcohol, en este caso metanol, en presencia de un catalizador. Entre los catalizadores más comunes se encuentran:

- BF_3 (Trifluoruro de Boro): Catalizador ácido eficaz que asegura una rápida formación de FAME. Es ampliamente utilizado en metodologías estándar como AOAC 991.39 y AOCS Ce 1b-89.
- H_2SO_4 (Ácido Sulfúrico): Catalizador ácido más económico, aunque puede ser menos eficiente en la esterificación de ácidos grasos poliinsaturados.
- Bases como NaOH o KOH: Alternativas para la transesterificación de triglicéridos a FAME.

2.4.2. Impacto en el Protocolo Analítico

La calidad de la esterificación afecta directamente la precisión y exactitud del análisis de EPA y DHA. Por ejemplo:

- Una esterificación incompleta puede resultar en picos mal definidos en el cromatograma.
- La selección del catalizador y las condiciones de reacción (tiempo, temperatura, proporción reactiva) debe garantizar una conversión completa sin degradación del analito de interés (AOAC, 1991; Christie, 1993).

2.4.3. Factores para considerar en la selección del catalizador

La elección del catalizador óptimo para la esterificación en el análisis de ácidos grasos poliinsaturados, como el EPA y el DHA, es fundamental para garantizar la calidad y precisión de los resultados. A continuación, se presentan los principales factores que deben ser considerados:

2.4.3.1. Estabilidad de los Ácidos Grasos Poliinsaturados

Los ácidos grasos como el EPA y el DHA son altamente sensibles a condiciones extremas de temperatura y a catalizadores agresivos. Por esta razón, es esencial seleccionar un catalizador que minimice el riesgo de degradación durante el proceso de esterificación (Felizardo & Correia, 2007).

2.4.3.2. Eficiencia de la Reacción

El catalizador debe garantizar una conversión completa de los ácidos grasos libres en sus correspondientes ésteres metílicos (FAME) para evitar la formación de subproductos o picos residuales en el cromatograma. Catalizadores como el BF_3 en metanol han demostrado ser altamente efectivos para este propósito, según las metodologías establecidas por AOAC 991.39 y AOCS Ce 1b-89 (AOAC, 1991; AOCS, 2005).

2.4.3.3. Compatibilidad con el Método Cromatográfico

El catalizador seleccionado no debe generar interferencias o artefactos que afecten la separación y cuantificación en la cromatografía de gases. Por ejemplo, el uso de BF_3 asegura una preparación de muestras limpia y adecuada para análisis capilares (Christie, 1993).

2.4.3.4. Facilidad de Uso y Seguridad

La toxicidad y las precauciones de manejo asociadas con ciertos catalizadores, como el BF_3 , deben considerarse en comparación con alternativas más accesibles, como el H_2SO_4 o NaOH . Si bien estos últimos pueden ser más económicos, presentan limitaciones en términos de eficiencia y compatibilidad para ácidos grasos poliinsaturados (Felizardo & Correia, 2007).

2.4.4. Normativas Aplicables

Normas internacionales, reconocidas en Chile como la AOAC 991.39 y la AOCS Ce 1b-89 describen procedimientos estandarizados para la esterificación en aceites marinos, incluyendo la preparación de muestras, elección del catalizador y optimización de condiciones de reacción. Estas directrices garantizan que el proceso sea reproducible y adecuado para aplicaciones en la industria del aceite de pescado.

En el caso de Chile, la Guía de Validación de Métodos Analíticos de SERNAPESCA (2018) también resalta la importancia de la preparación adecuada de muestras en el análisis de productos pesqueros. Esto incluye la esterificación como un paso crítico para asegurar resultados confiables.

2.5. PROTOCOLO DEL METODO ANALITICO

2.5.1. Objetivo

Este protocolo tiene como objetivo describir el procedimiento para determinar la composición de ácidos grasos en aceites marinos, con énfasis en la cuantificación de EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) en valores relativos (% de área) y absolutos (mg/g) utilizando cromatografía de gases

2.5.2. Alcance

Este método es aplicable al análisis de aceites marinos, incluyendo ésteres etílicos o metílicos de aceites marinos, así como cápsulas de EPA y DHA y otros ácidos grasos poliinsaturados.

2.5.3. Elementos de protección personal

- Lentes de seguridad
- Delantal
- Guantes de procedimiento

2.5.4. Riesgos asociados al procedimiento y medidas preventivas.

- Mantener cerrados los envases de productos químicos
- Rotular los envases y leer los rótulos antes de usar.
- Capacitación del método y procedimientos.
- Mantener actualizado el conocimiento sobre productos químicos y procedimientos

2.5.5. Materiales y Equipos

- Cromatógrafo de Gases (GC) con:
- Inyector Split/Splitless para columnas capilares.
- Horno con programación de temperatura.
- Detector de Ionización de Llama (FID).
- Sistema de adquisición y tratamiento de datos.
- Autosampler.
- Columna Capilar: Carbowax 20M o equivalente (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m).
- Balanza analítica (sensibilidad 0.1 mg).
- Agitador mecánico tipo vórtex.
- Tubos de vidrio (16 x 125 mm) con tapa rosca recubierta con PTFE.
- Viales cromatográficos de 2 mL con septa recubierta de PTFE.
- Baño de agua termorregulable a 100°C.
- Matraces aforados (25 mL y 100 mL).
- Micropipetas de 100 μ L y 1000 μ L.

2.5.6. Reactivos

- Isooctano (grado cromatografía).
- Hidróxido de sodio (NaOH) p.a.
- Metanol p.a.
- Solución de BF₃ al 14% en metanol.
- Cloruro de sodio (NaCl) p.a.
- Patrón interno: C23:0 metil éster.

- Agua destilada.

2.5.7. Soluciones

- Solución de NaOH 0.5 N en metanol: Disolver 2 g de NaOH en 100 mL de metanol.
- Solución de NaOH 1.5 N en metanol: Disolver 6 g de NaOH en 100 mL de metanol.
- Solución saturada de NaCl: Disolver 36 g de NaCl en 100 mL de agua destilada.

2.5.8. Preparación de la Muestra y del Patrón Interno

2.5.8.1. Preparación del Patrón Interno (C23:0 Metil Éster)

- 1) Pesar 75 mg $\pm$ 0.1 mg de patrón interno (C23:0 metil éster) en un matraz aforado de 25 mL.
- 2) Aforar con Isooctano y calcular la concentración real (mg/mL).
- 3) Tomar 1 mL de esta solución y transferirlo a un tubo de vidrio con tapa de PTFE.
- 4) Evaporar el solvente con una corriente de nitrógeno.
- 5) Almacenar el tubo en un congelador si no se utiliza inmediatamente (duración: 1 mes).

2.5.8.2. Preparación de la Muestra

- 1) Pesar entre 30 – 50 mg $\pm$ 0.1 mg de la muestra de aceite marino en un tubo de vidrio con tapa de PTFE que contenga el patrón interno.
- 2) Registrar el peso de la muestra en el cuaderno de laboratorio.

2.5.9. Proceso de Saponificación y Esterificación

2.5.9.1. Saponificación

- 1) Agregar 2 mL de solución de NaOH 0.5 N en metanol a la muestra en el tubo de vidrio.
- 2) Soplar con nitrógeno y tapar bien el tubo.
- 3) Agitar en vórtex durante al menos 15 segundos.
- 4) Calentar en baño de agua a 100°C durante 5 minutos.

2.5.9.2. Esterificación

- 1) Enfriar el tubo a temperatura ambiente.
- 2) Agregar 2.5 mL de solución de BF₃ al 14% en metanol.
- 3) Agitar en vórtex durante 15 segundos y calentar nuevamente en baño de agua a 100°C durante 30 minutos.
- 4) Enfriar el tubo a 30-40°C.

2.5.10. Extracción y Preparación para el Análisis

2.5.10.1. Extracción de FAMES

- 1) Agregar 2.5 mL de Isooctano al tubo.
- 2) Agitar en vórtex durante 15 segundos.
- 3) Agregar 5 mL de solución saturada de NaCl para separar las fases orgánica y acuosa.
- 4) Agitar en vórtex nuevamente y dejar reposar para decantar.
- 5) Transferir la fase orgánica (superior) a un vial cromatográfico de 2 mL utilizando una pipeta Pasteur.
- 6) Tapar el vial y asegurar el sellado con septa recubierta de PTFE.

2.5.11. Análisis por Cromatografía de Gases

- ❖ Inyectar 1 µL de la fase orgánica (FAMES) en el cromatógrafo de gases bajo las siguientes condiciones:
 - Inyector: 250°C, Split 1:30.
 - Horno:
 - 1) Inicial: 50°C durante 3 minutos.
 - 2) Rampa: Incremento de 4°C/min hasta 240°C.
 - 3) Mantener a 240°C hasta que todos los picos hayan salido.
 - 4) Detector (FID): 250°C.
 - 5) Gas Portador: Hidrógeno, flujo de 1 mL/min.
 - 6) Inyectar 1 µL de estándar de FAMES para obtener los tiempos de retención de los ácidos grasos de interés.

2.5.12. Cuantificación de Resultados

2.5.12.1. Cuantificación Relativa (% de área)

El porcentaje de cada ácido graso se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácido graso X} = A_x / A_t * 100$$

- A_x : Área del metil éster del ácido graso X.
- A_t : Área total del cromatograma.

2.5.12.2. Cuantificación Absoluta (mg/g)

La cantidad de EPA o DHA en mg/g de aceite se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{EPA o DHA (mg/g)} = \frac{A_x * PPI * CFX * 1000}{API * PM * 1,04}$$

Donde:

- A_x : Área del metil éster de EPA o DHA.
- PPI: Masa del patrón interno en el tubo (mg).

- CFX: Factor de corrección del detector para EPA o DHA (EPA = 0.99, DHA = 0.97).
- API: Área del metil éster del patrón interno (C23:0).
- PM: Masa de la muestra (mg).
- Factor 1.04: Relación entre la masa molecular del metil éster y el ácido graso.

2.5.13. Control de Calidad

- Asegurar que los estándares y patrones internos sean frescos y debidamente almacenados.
- Realizar pruebas de blancos (blancos de solvente) para verificar la limpieza de los reactivos.
- Revisar los resultados de estándares para asegurar que los tiempos de retención y áreas estén dentro de los rangos aceptables

2.6. ANTECEDENTES DEL MÉTODO ANALÍTICO

El protocolo propuesto para la cuantificación de ácidos grasos EPA y DHA en aceite de pescado se basa en los métodos oficiales AOCS Ce 1b-89 y AOAC 991.39, ampliamente utilizados y validados a nivel nacional e internacional para la determinación de la composición de ácidos grasos en aceites marinos mediante cromatografía de gases. Estos métodos utilizan BF_3 en metanol como agente de esterificación, lo que garantiza la derivatización eficiente de los ácidos grasos presentes en el aceite de pescado.

Los métodos AOCS Ce 1b-89 y AOAC 991.39 están diseñados específicamente para determinar la composición de ácidos grasos en aceites marinos, incluyendo EPA y DHA. La AOCS, es una de las principales organizaciones en análisis de aceites y grasas a nivel mundial, lo que da un gran respaldo normativo para validar que el protocolo de este proyecto cumple con estándares internacionales y aceptado en la normativa chilena al igual que la AOAC que es la asociación de analistas oficiales de química, organización internacional que se dedica a promover la calidad y precisión de los análisis químicos.

En las figuras 3 y 4 y 5, se presentan uno cromatogramas típicos generados a partir de la cuantificación de ácidos grasos en aceites marinos mediante cromatografía de gases. Cada pico corresponde a un ácido graso derivatizado en éster metílico, y la claridad de la separación entre los picos refleja la especificidad del método. Estos cromatogramas demuestran la capacidad del protocolo.

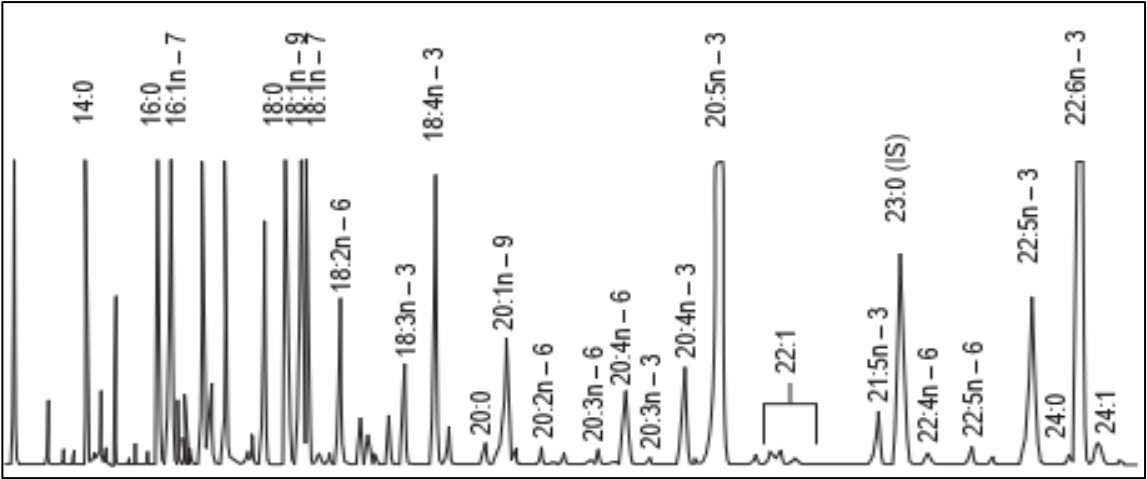


Fig. 2-6. Ésteres metílicos de ácidos grasos de suave gelatina encapsulada, el aceite de lacha vapor desodorizado (muestra de estudio en colaboración 1) analizado en una sílice fundida flexible columna capilar (30 m × 0,25 mm), recubiertos con Supelcowax-10. Ver tabla 1.

ácido graso	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención relativa	Area percent
14:0	4.14	0.335	8.3
16:0	7.13	0.578	18.7
16:1n-7	7.66	0.621	12.1
18:0	12.34	1.00	3.1
18:1n-9	12.97	1.05	11.9
18:1n-7	13.22	1.07	
18:2n-6	14.57	1.18	1.2
18:3n-3	17.08	1.38	0.8
18:4n-3	18.38	1.40	2.9
20:0	20.32	1.65	0.2
20:1n-11	20.91	1.69	1.8
20:1n-9	21.12	1.71	
20:2n-6	23.37	1.89	0.1
20:3n-6	24.66	2.00	0.2
20:3n-3	26.66	2.16	0.2
20:4n-6	25.74	2.09	0.8
20:4n-3	28.07	2.27	1.3
20:5n-3 EPA	29.29	2.37	13.8
22:0	30.32	2.46	0.2
22:1n-11+13	31.27	2.53	1.4
22:1n-9	31.63	2.56	
22:4n-6	37.17	3.03	0.2
22:5n-6	38.83	3.14	0.2
22:5n-3	41.11	3.33	2.1
22:6n-3 DHA	42.86	3.47	7.9
24:0	42.45	3.44	0.1
24:1n-9	43.54	3.52	0.3

Tabla 2-7. Límites de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ) Mehaden: Es un pescado, que se utiliza como fertilizante, alimento para animales y cebo para la pesca, es una fuente importante de ácidos grasos omega -3.

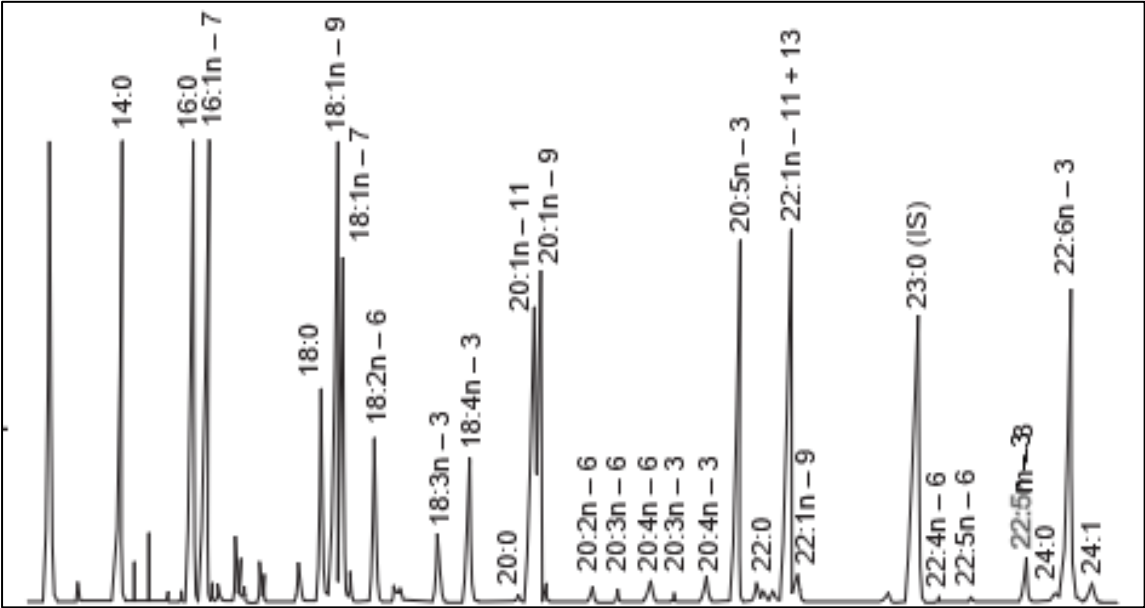


Fig. 2-7. Ésteres etílicos de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao un producto comercial suaves de gelatina encapsulada, Super EPA 500 (muestra de estudio de colaboración 2) analizado en una sílice fundida flexible columna capilar (30 m × 0,25 mm), recubiertos con Supelcowax-10, bajo las condiciones mencionadas en la técnica.

Ácido graso	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención relativa	% Área
14:0	4.17	0.335	5.7
16:0	7.17	0.576	13.3
16:1n-7	7.71	0.620	8.8
18:0	12.44	1.00	2.3
18:1n-9	13.08	1.05	18.0
18:1n-7	13.32	1.07	
18:2n-6	14.68	1.18	2.0
18:3n-3	17.20	1.38	1.0
18:4n-3	18.50	1.49	2.0
20:0	20.47	1.65	0.2
20:1n-11	21.08	1.69	10.0
20:1n-9	21.28	1.71	
20:2n-6	23.52	1.89	0.3
20:3n-6	24.81	1.99	0.1
20:3n-3	26.86	2.16	0.1
20:4n-6	25.91	2.08	0.4
20:4n-3	28.25	2.27	0.6
20:5n-3 EPA	29.43	2.37	7.8
22:0	30.50	2.45	0.3
22:1n-11+13	31.50	2.53	9.0
22:1n-9	31.83	2.56	
22:4n-6	37.70	3.03	0.2
22:5n-6	39.04	3.14	0.1
22:5n-3	41.32	3.32	1.0
22:6n-3 DHA	43.77	3.52	7.0
24:0	42.67	3.43	0.2
24:1	43.77	3.52	0.9

Tabla 2-8. Tiempos de retención y el porcentaje de área de ésteres metílicos de aceite de hígado de bacalao (muestra de estudio colaborativo 3).

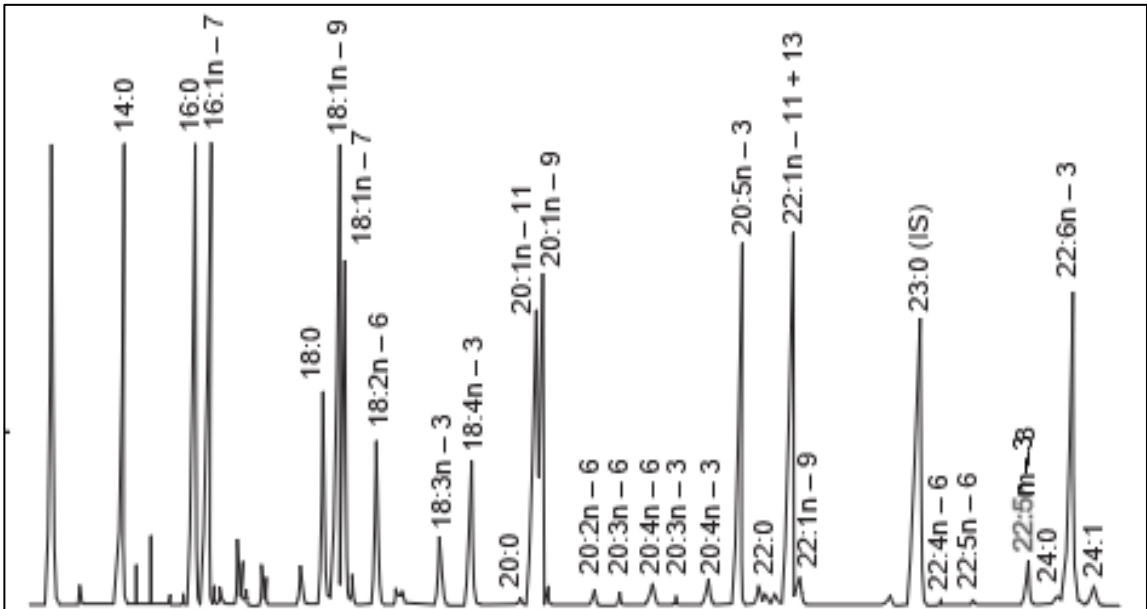


Fig. 2-8. Cromatograma de ésteres metílicos de aceite de hígado de bacalao (muestra de estudio colaborativo 3) analizados en una columna capilar flexible de sílice fundida (30 m 0,25 mm), recubierta con Supelcowax-10, en las condiciones indicadas en el método. *Ver tabla 2*

En conjunto, los cromatogramas de las figuras 7, 8 y 9 del método AOCS Ce 1b-89 proporcionan un respaldo sólido para la validación del protocolo propuesto en este proyecto. El cromatograma típico (**figura 7**) demuestra la **eficiencia de la separación cromatográfica** y la capacidad de detectar ácidos grasos esenciales como EPA y DHA. Los cromatogramas de las figuras 8 y 9 y tabla 1 y 2 valida la **aplicabilidad del método** en diferentes aceites marinos. Estos datos refuerzan la robustez del protocolo y su adecuación para el análisis de aceites de pescado en el contexto de la industria alimentaria y comercial.

	Muestras <i>a</i>	1	2	3	4	5	6
x_i %	14:0	8.3	0.4	5.7	7.0	5.4	8.3
	16:0	18.7	0.9	13.3	15.0	7.8	19.0
	18:0	3.1	2.1	2.3	2.9	0.8	3.1
	18:1	11.9	8.7	18.0	14.1	10.2	11.9
	18:4n-3	2.9	1.9	2.0	2.1	4.4	2.9
	20:1	1.8	14.2	10.0	3.2	1.3	1.8
	20:5n-3	13.8	26.4	7.8	17.0	27.5	13.4
	22:1	1.4	10.6	9.0	2.4	1.0	1.3
	22:5n-3	2.0	4.3	1.0	2.1	2.2	2.0
	22:6n-3	7.9	18.7	7.0	12.3	12.5	7.8
RSD_R	14:0	11.7	17.1	13.1	8.3	12.0	11.6
	16:0	7.0	12.2	7.5	6.9	5.7	10.0
	18:0	3.6	7.0	3.1	14.4	5.6	5.7
	18:1	1.9	5.7	2.8	3.0	6.7	3.6
	18:4n-3	2.4	7.6	4.2	6.3	5.5	4.5
	20:1	8.0	3.2	4.5	9.7	18.1	16.2
	20:5n-3	5.8	5.6	5.5	7.4	7.5	9.8
	22:1	17.2	4.7	8.9	10.0	13.4	16.1
	22:5n-3	14.6	8.5	9.7	12.2	8.8	16.2
	22:6n-3	16.1	7.5	9.9	11.7	7.5	15.5
x_i mg/g	20:5n-3	115.3	223.1	64.3	157.5	241.4	117.7
	22:6n-3	66.0	157.9	56.4	105.3	105.4	67.2
RSD_R	20:5n-3	6.0	9.2	7.7	19.8	5.4	7.9
	22:6n-3	4.2	9.0	8.3	12.6	5.2	8.6
		x_i %	RSD_R				

	14:0	8.3	5.8	
	16:0	18.7	2.9	
	18:0	3.1	1.8	
	18:1	11.9	1.6	
	18:4n-3	2.9	1.5	
	20:1	1.8	7.3	
	20:5n-3	13.8	1.9	
	22:1	1.4	7.9	
	22:5n-3	2.0	6.7	
	22:6n-3	7.9	3.7	
	x, mg/g			
x, mg/g	20:5n-3	116.5	5.9	
	22:6n-3	66.6	5.3	
Todas las muestras fueron encapsuladas en gelatina blanda. 1. Aceite de Menhaden desodorizado al vapor. 2. Preparación comercial de éster etílico. 3. Aceite de hígado de bacalao. 4. Aceite de pescado comercial. 5. Aceite de pescado comercial enriquecido en EPA y DHA. 6. Aceite de Menhaden desodorizado al vapor (duplicación ciega de la muestra 1).				

Tabla 2-9. Análisis estadístico de los resultados de 6 aceites de pescado basados en los resultados recibidos de 6 laboratorios.

2.7. CONCLUSIÓN DEL CAPÍTULO 2: PROTOCOLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

El Capítulo 2 se centra en el desarrollo del protocolo detallado para la cuantificación de los ácidos grasos esenciales EPA y DHA en aceite de pescado mediante cromatografía de gases (GC). Este protocolo sigue las normativas internacionales y nacionales, como las de la AOAC (1991) y AOCS Ce 1b-89, y está alineado con la Guía de Validación de Métodos Analíticos de SERNAPESCA (2018) para asegurar la confiabilidad, precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

El proceso incluye una etapa crucial de esterificación, donde los ácidos grasos del aceite se convierten en ésteres metílicos para facilitar su análisis mediante cromatografía. Esta esterificación es esencial para garantizar que los compuestos sean volátiles y estables, optimizando la eficiencia del análisis. El protocolo cromatográfico se ha diseñado para maximizar la resolución y precisión del análisis, utilizando hidrógeno como gas portador, que se ha justificado por su eficiencia y menor costo.

Además, el protocolo detalla los procedimientos de validación del método, que incluyen la evaluación de la linealidad, precisión, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), todos alineados con los estándares internacionales y nacionales. Este enfoque asegura que el método propuesto sea robusto, confiable y adecuado para la industria pesquera.

El protocolo analítico descrito establece un marco técnico claro y preciso para la implementación del análisis de EPA y DHA, asegurando que el laboratorio cumpla con las expectativas de calidad y confiabilidad, al mismo tiempo que se posiciona como un referente en la industria para el análisis de aceites marinos.

CAPÍTULO 3. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

3.1. INTRODUCCIÓN AL PROTOCOLO DE VALIDACION

El presente protocolo de validación tiene como objetivo asegurar la fiabilidad, precisión y reproducibilidad del método analítico utilizado para la cuantificación de los ácidos grasos esenciales EPA (ácido eicosapentaenoico, C20:5n-3) y DHA (ácido docosahexaenoico, C22:6n-3) en aceites de pescado mediante cromatografía de gases (GC). Este proceso de validación es esencial para cumplir con los estándares de calidad y normativas exigidos por SERNAPESCA, en línea con las normativas internacionales y guías como la ISO 5725, CE/657/2002 y Eurachem.

La creciente demanda de productos ricos en ácidos grasos omega-3, como el EPA y el DHA, ha llevado a la necesidad de métodos analíticos robustos que garanticen la cuantificación precisa y reproducible de estos compuestos en diversas matrices. La validación de este método es crucial para garantizar que los resultados obtenidos en los análisis sean confiables y puedan ser utilizados tanto en estudios de investigación como en aplicaciones industriales y comerciales.

Este protocolo se fundamenta en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de SERNAPESCA, que establece los lineamientos necesarios para evaluar la capacidad del método en términos de precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, y límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) y especificidad.

El proceso de validación se llevará a cabo mediante una serie de ensayos que abarcan un rango amplio de concentraciones de EPA y DHA, siguiendo las condiciones operativas estándar del método de cromatografía de gases. Los resultados obtenidos serán evaluados en comparación con los criterios de aceptación establecidos por las normativas internacionales y las directrices de SERNAPESCA.

La finalidad de este protocolo es garantizar que el método de análisis propuesto cumpla con los requisitos necesarios para su implementación rutinaria en el análisis de aceites de pescado, asegurando que los resultados sean confiables, reproducibles y adecuados para la cuantificación de ácidos grasos esenciales en muestras complejas.

3.1.1. Parámetros para validar

1. Linealidad de la curva de calibración
2. Precisión, tanto en términos de repetibilidad (intra-laboratorio) como de reproducibilidad (inter-laboratorio si es aplicable).
3. Exactitud.
4. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).
5. Especificidad

3.1.2. Importancia de la validación del método

La validación del protocolo analítico para la cuantificación de ácidos grasos EPA y DHA en aceites marinos es un paso esencial para garantizar la confiabilidad, reproducibilidad y calidad de los resultados. En el contexto de la industria pesquera, donde la calidad del aceite de pescado tiene un impacto directo en su valor comercial y en su aceptación en mercados internacionales, un método validado asegura que el análisis cumple con estándares normativos y expectativas de los clientes.

3.1.2.1. Garantizar la Confiabilidad de los Resultados

La validación de métodos analíticos implica evaluar parámetros como la precisión, exactitud, linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), entre otros. Estos criterios permiten confirmar que el protocolo propuesto produce resultados consistentes y representativos bajo condiciones operativas definidas (ISO, 2019; SERNAPESCA, 2018). Por ejemplo, la precisión asegura que los resultados son reproducibles, mientras que la exactitud verifica que las mediciones están libres de sesgos significativos (AOAC, 1991).

3.1.2.2. Cumplimiento de Normativas nacionales e Internacionales

Normas reconocidas como la AOAC 991.39 y la AOCS Ce 1b-89 establecen directrices específicas para la cuantificación de ácidos grasos en aceites marinos mediante cromatografía de gases. Validar el protocolo propuesto según estos estándares garantiza que los resultados sean aceptados en mercados nacionales e internacionales y respalda la credibilidad del laboratorio (AOCS, 2005; AOAC, 1991).

3.1.2.3. Reducción de Errores y Mejora en la Toma de Decisiones

Un protocolo validado minimiza los errores asociados con la preparación de muestras, el análisis cromatográfico y la interpretación de los resultados. Esto es especialmente importante en la industria pesquera, donde los análisis sirven como base para decisiones críticas relacionadas con la calidad del producto y su precio de mercado (Christie, 1993).

3.1.2.4. Adaptabilidad al Contexto Nacional

En el caso de Chile, la guía de validación de métodos analíticos de SERNAPESCA proporciona un marco específico para productos pesqueros y acuícolas, incluyendo los aceites de pescado. Seguir estas directrices no solo asegura el cumplimiento normativo, sino que también posiciona al laboratorio como un referente técnico dentro del sector (SERNAPESCA, 2018).

3.1.2.5. Fortalecimiento del Control de Calidad

La implementación de un método validado permite a las empresas pesqueras reforzar su control interno de calidad, asegurando que el contenido de EPA y DHA cumple con los estándares requeridos por los mercados internacionales. Esto genera confianza en los consumidores y fortalece la competitividad del sector (FAO, 2021).

3.1.3. Objetivos de la Validación

3.1.3.1. Objetivo General:

- Garantizar que el protocolo analítico para la cuantificación de EPA y DHA cumple con los parámetros establecidos en normativas nacionales e internacionales.

3.1.3.2. Objetivos Específicos:

- Evaluar la precisión y exactitud del método.
- Establecer los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).
- Verificar la linealidad del método mediante curvas de calibración.
- Asegurar la especificidad del método para los compuestos de interés

3.2. PROTOCOLO

3.2.1. Linealidad

3.2.1.1. Objetivo

- Verificar si la respuesta instrumental del método (área de los picos en el cromatograma) es proporcional a la concentración de EPA y DHA en un rango de trabajo específico. Esto asegura que el método analítico sea adecuado para cuantificar los compuestos objetivo en muestras de aceite de pescado.

3.2.1.2. Criterios de Aceptación

- El coeficiente de correlación (R^2) debe ser igual o superior a 0.99.
- La desviación porcentual entre los valores calculados y los valores teóricos no debe exceder el 5%.

3.2.1.3. Materiales y equipos

- Solución madre de 500 ppm: Preparada con estándares certificados de EPA y DHA disueltos en metanol.

- Metanol (grado cromatográfico): Solvente para diluciones y preparación de soluciones estándar.
- Matraz aforado de 100 ml: 5 unidades.
- Pipetas volumétricas: 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml y 25 ml.
- Cromatógrafo TRACE 1600 con detector FID.
- Campana de extracción: Para garantizar la seguridad al manipular metanol.
- Balanza analítica: Para la preparación precisa de la solución madre.
- Viales y autosampler: Para la inyección de las soluciones estándar en el cromatógrafo.

3.2.1.4. Precauciones de seguridad

I. Manejo del Isooctano:

- Usar guantes de nitrilo, gafas de seguridad y delantal de laboratorio.
- Realizar todas las manipulaciones dentro de una campana de extracción.
- Almacenar el metanol en frascos etiquetados y en áreas ventiladas, conforme al Decreto Supremo N° 43 de 2015.

3.2.1.5. En caso de emergencia

- Lavar con agua abundante en caso de contacto con piel u ojos.
- Para inhalación, trasladar a la persona a un área ventilada y buscar atención médica si los síntomas persisten.

3.2.1.6. Disposición de residuos:

- Desechar los residuos de Isooctano en contenedores etiquetados para solventes orgánicos, según las directrices del Decreto Supremo N° 57 de 2019.

3.2.1.7. Preparación de Soluciones Estándar

I. Solución Madre de 500 ppm

- 1) Pesar 50 mg de EPA y DHA utilizando una balanza analítica.
- 2) Transferir los estándares a un matraz aforado de 100 ml.
- 3) Completar hasta el aforo con Isooctano y homogeneizar.
- 4) Etiquetar el matraz como “Solución madre de 500 ppm” con la fecha de preparación.

II. Diluciones

Preparar las soluciones estándar para el rango de trabajo utilizando matraces aforados de 100 ml:

Concentración (ppm)	Volumen de Solución Madre (ml)
25	$\frac{25 \times 100}{500} = 5$
50	$\frac{50 \times 100}{500} = 10$
75	$\frac{75 \times 100}{500} = 15$
100	$\frac{100 \times 100}{500} = 20$
125	$\frac{125 \times 100}{500} = 25$

Tabla 3-1. Diluciones para calcular linealidad.

3.2.1.8. Procedimiento

A. Inyección de Estándares

- 1) Inyectar cada solución estándar (25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm y 125 ppm) en el cromatógrafo TRACE 1600 por triplicado.
- 2) Registrar las áreas de los picos correspondientes a EPA y DHA para cada concentración.

B. Generación de Curva de Calibración

- 1) Graficar las concentraciones estándar (eje x) frente a las áreas promedio de los picos (eje y)
- 2) Ajustar los puntos experimentales a una recta de regresión lineal ($y=mx+b$).
- 3) Calcular el coeficiente de correlación (R^2).

Concentración (ppm)	Área promedio EPA	Área promedio DHA	Respuesta predicha (EPA)	Respuesta predicha (DHA)	Desviación (%)
25	120	150	125	155	4,0
50	350	400	360	405	2,5
75	600	750	610	740	1,67

Tabla 3-2. Ejemplo de resultados de curva de calibración.

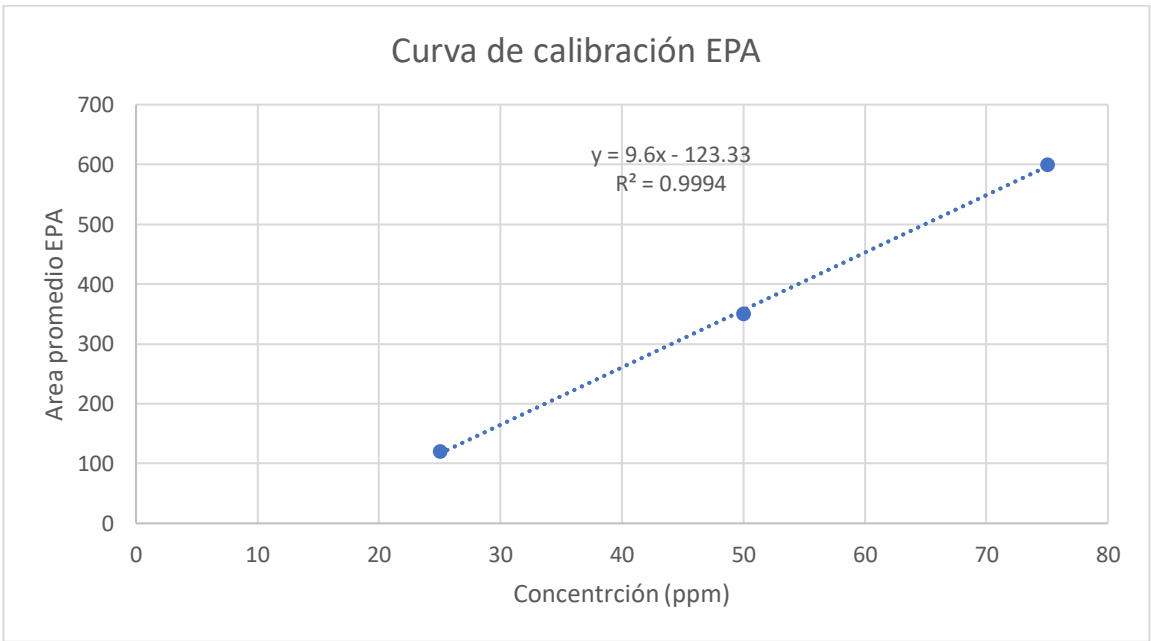


Fig. 3-1. Curva de calibración EPA.

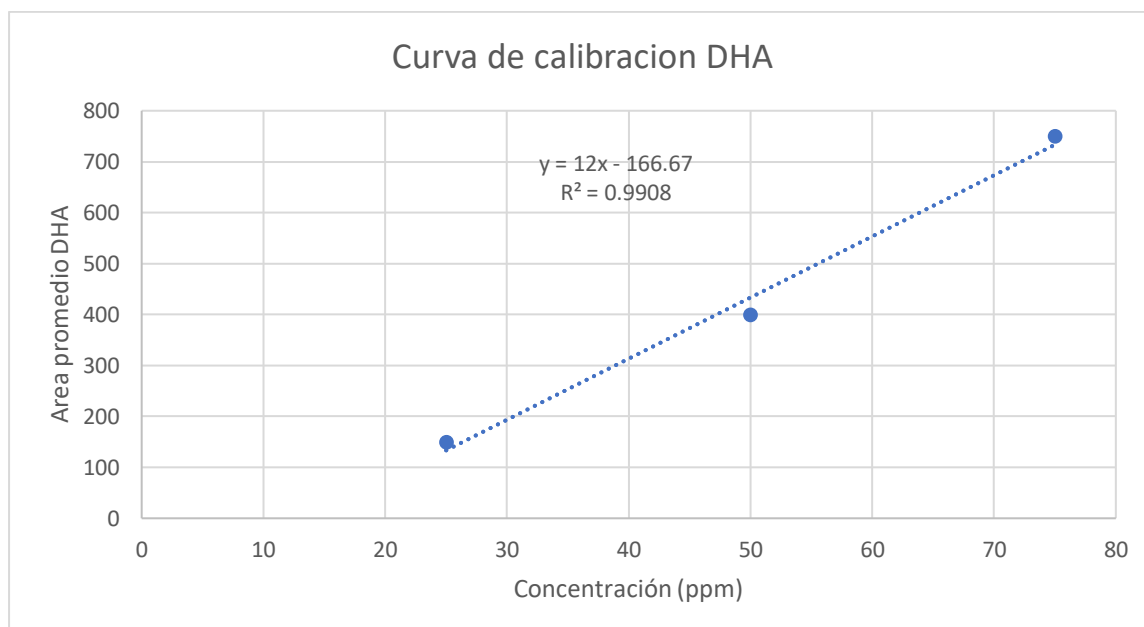


Fig. 3-2. Curva de calibración DHA.

3.2.1.9. Conclusión

La linealidad del método será validada si R^2 es igual o mayor a 0.99 y las desviaciones porcentuales cumplen con los criterios establecidos. Esto confirmará que el método es adecuado para cuantificar EPA y DHA en el rango especificado.

3.2.2. Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)

3.2.2.1. Introducción

La precisión es un parámetro crítico en la validación de métodos analíticos, ya que evalúa la consistencia de los resultados obtenidos bajo condiciones repetitivas y reproducibles. Este protocolo aborda la precisión intra-laboratorio (repetibilidad) y entre laboratorios o días (reproducibilidad) para garantizar la confiabilidad del método analítico.

3.2.2.2. Objetivo

Evaluar la precisión del método analítico para la cuantificación de EPA y DHA en aceite de pescado, midiendo la variabilidad de los resultados bajo las siguientes condiciones:

- Repetibilidad: Misma muestra, mismo analista, mismo equipo, en un período corto de tiempo.
- Reproducibilidad: Misma muestra, diferentes analistas, días o equipos.

3.2.2.3. Materiales y Equipos

- Soluciones estándar: Preparadas en concentraciones de 25 ppm, 75 ppm y 125 ppm.
- Aceite de pescado: Muestras representativas para la validación.

- Cromatógrafo TRACE 1600 con detector FID.
- Isooctano (grado cromatográfico): Solvente para preparación de soluciones.
- Viales y Autosampler: Para inyecciones precisas.

3.2.2.4. Procedimiento

A. Repetibilidad (Intra-laboratorio)

1) Preparación de muestras:

- Preparar tres concentraciones diferentes (25 ppm, 75 ppm y 125 ppm) de EPA y DHA en aceite de pescado.

2) Análisis por triplicado:

- Inyectar cada muestra en el cromatógrafo TRACE 1600 por triplicado, bajo condiciones idénticas (mismo equipo, analista y día).

3) Registro de datos:

- Registrar las áreas de los picos correspondientes a EPA y DHA para cada muestra.

4) Cálculo del coeficiente de variación (CV):

Calcular la media y la desviación estándar de las áreas de los picos para cada concentración.

5) Determinar el coeficiente de variación (CV) utilizando la fórmula:

$$CV = \frac{(\text{Desviación Estándar})}{\text{Media}} \times 100$$

6) Criterios de aceptación:

- El CV intra-laboratorio debe ser menor al 5%.

B. Reproducibilidad (Inter-laboratorio)

1) Preparación de muestras

- Utilizar las mismas concentraciones (25 ppm, 75 ppm y 125 ppm) que en la repetibilidad.

2) Análisis en diferentes condiciones

- Realizar el análisis en días distintos, con diferentes analistas o en diferentes equipos (si están disponibles).

3) Registro de datos:

- Registrar las áreas de los picos correspondientes a EPA y DHA para cada muestra

4) Cálculo del CV inter-laboratorio:

- Calcular la media y la desviación estándar para cada nivel de concentración considerando todas las réplicas.
- Determinar el CV inter-laboratorio utilizando la misma fórmula que en la repetibilidad.

5) Criterios de aceptación:

- El CV inter-laboratorio debe ser menor al 10-15%.

6) Resultados y Presentación

I. Tabla de resultados

- Presentar los valores de media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

Concentración (ppm)	Área promedio (EPA)	Desviación estándar (EPA)	CV (%)
25	120	4,8	4,0
75	600	18,0	3,0
125	1100	22,0	2,0

Tabla 3-3. Ejemplo de tabla para repetibilidad.

Concentración (ppm)	CV Intra-laboratorio (%)	CV Inter-laboratorio (%)
25	4,0	10,5
75	3,0	9,8
125	2,0	8,7

Tabla 3-4. Ejemplo de tabla para reproductibilidad.

II. Gráficos

Concentración (ppm)	Repetibilidad CV (%)	Reproducibilidad CV Inter-laboratorio (%)
25	4	10,5
75	3	9,8
125	2	8,7

Tabla 3-5. Datos de repetibilidad y reproductibilidad.

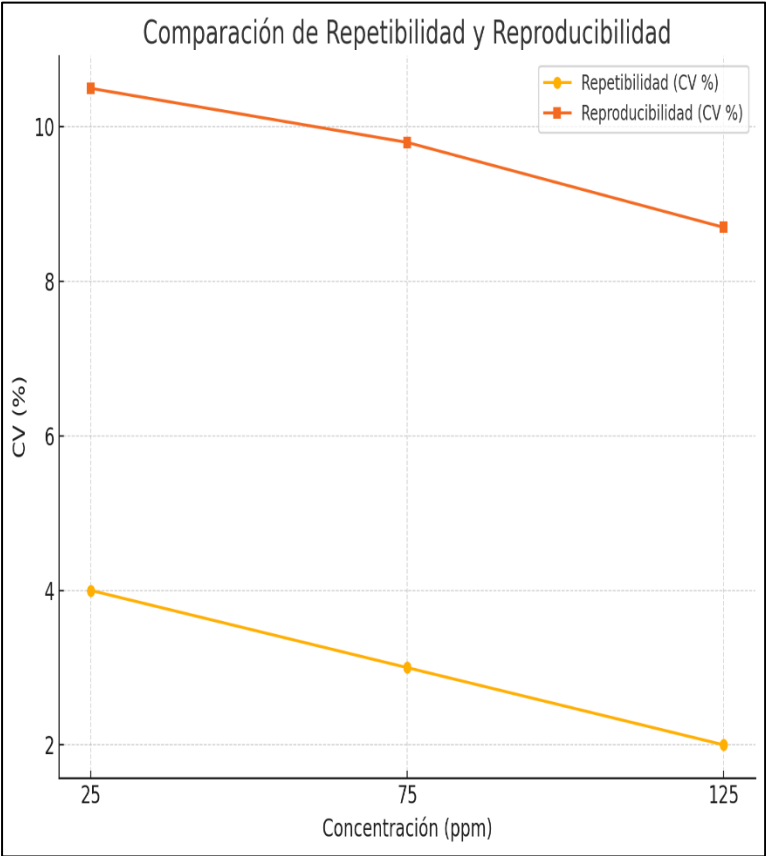


Fig. 3-3. Comparación de repetibilidad y reproductibilidad.

III. Interpretación del gráfico

- El gráfico muestra la relación entre la concentración de la muestra (ppm) y los coeficientes de variación (CV %), que representan la precisión del método en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

1) Repetibilidad (CV %):

- Refleja la variación cuando el análisis es realizado bajo las mismas condiciones (mismo laboratorio, equipo, operador).
- Disminuye conforme aumenta la concentración, lo que indica que el método es más preciso (menor variación) para concentraciones más altas.

2) Reproducibilidad (CV %):

- Mide la variación entre diferentes laboratorios o condiciones (equipos, operadores).
- También disminuye con el aumento de la concentración, aunque los valores son consistentemente mayores que los de la repetibilidad, reflejando mayor variabilidad entre laboratorios.

3.2.3. Exactitud.

3.2.3.1. Introducción

La exactitud mide qué tan cerca están los resultados obtenidos del valor real o verdadero. En este protocolo, la exactitud se evaluará mediante ensayos de recuperación, utilizando concentraciones conocidas de EPA y DHA en muestras fortificadas de aceite de pescado.

3.2.3.2. Objetivo

- Verificar la capacidad del método analítico para producir resultados que reflejen con precisión las concentraciones reales de EPA y DHA en aceite de pescado.

3.2.3.3. Materiales y Equipos

- Aceite de pescado: Muestra representativa como matriz base.
- Soluciones estándar de EPA y DHA: Preparadas previamente con Isooctano (25 ppm, 50 ppm, y 100 ppm).
- Cromatógrafo TRACE 1600 con detector FID.
- Viales y Autosampler: Para inyección de las soluciones en el cromatógrafo.
- Micropipetas: Para fortificar las muestras con precisión.
- Isooctano (grado cromatográfico): Solvente para diluciones, más reactivos y soluciones del método.

3.2.3.4. Procedimiento

I. Fortificación de Muestras

1) Preparación de la muestra base:

- Tomar una muestra de aceite de pescado (sin fortificar) y confirmar que no contenga cantidades detectables de EPA y DHA.

2) Fortificación:

- Añadir volúmenes conocidos de las soluciones estándar de EPA y DHA para obtener concentraciones finales de 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm en la muestra.
- Ejemplo: Para fortificar 10 ml de muestra con una concentración de 50 ppm:

$$V_{\text{estándar}} = \frac{C_{\text{deseada}} \times V_{\text{muestra}}}{C_{\text{estándar}}}$$

Donde:

- C deseada: Concentración final deseada (50 ppm).
- V muestra: Volumen de la muestra (10 ml)
- C estándar: Concentración de la solución estándar (500 ppm).

$$V_{\text{estándar}} = \frac{50 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{500 \text{ ppm}} = 1 \text{ ml}$$

3) Homogeneizar:

- Mezclar bien la muestra fortificada para garantizar una distribución uniforme de los analitos.

II. Análisis Cromatográfico

1) Inyección:

- Inyectar cada muestra fortificada en el cromatógrafo por triplicado.

2) Registro de resultados:

- Registrar las áreas de los picos correspondientes a EPA y DHA para cada réplica.

III. Cálculo de Recuperación

1) Fórmula:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{(\text{Concentración encontrada})}{\text{Concentración añadida}} \times 100$$

2) Ejemplo:

Si la concentración añadida fue de 50 ppm y el análisis reportó 48.5 ppm:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{48,5 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} \times 100 = 97 \%$$

3) Criterios de aceptación:

Los valores de recuperación deben estar entre el 95% y el 105%.

3.2.3.5. Resultados y Presentación

1) Tabla de Resultados:

Concentración Añadida (ppm)	Concentración Encontrada (ppm)	Recuperación (%)
50	48,5	97,0
100	102,4	102,4
150	149,3	99,5

Tabla 3-6. Resultados de exactitud.

2) Gráfico:

Representa las concentraciones añadidas frente a las concentraciones encontradas, con una línea de referencia de 100% de recuperación.

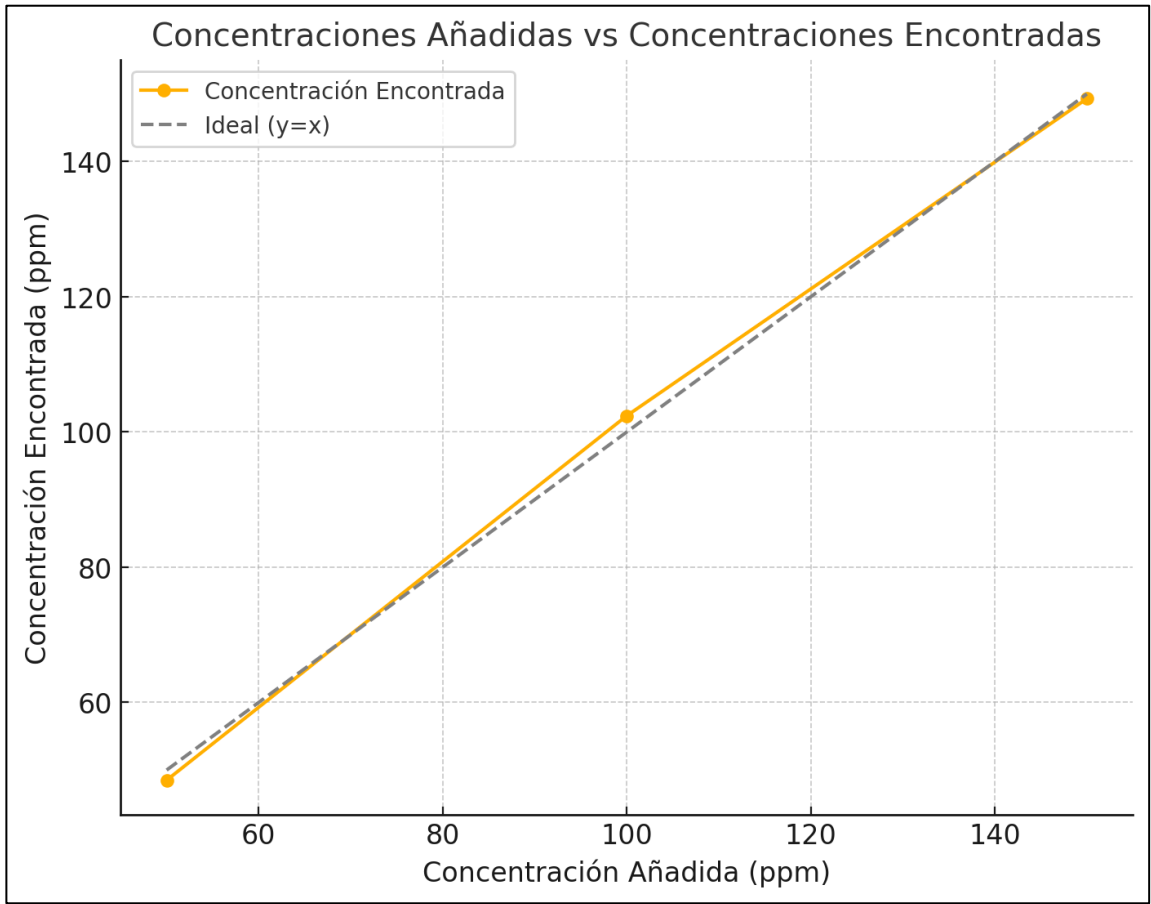


Fig. 3-4. Concentraciones añadidas vs. Concentraciones encontradas.

3) Interpretación del gráfico:

- Este gráfico representa la relación entre las concentraciones añadidas (valores en el eje x) y las concentraciones encontradas (valores en el eje y), mostrando cómo se comportan los datos experimentales en comparación con una línea ideal ($y=x$).
- En general, los puntos están bastante cerca de la línea ideal, lo que indica que el método es preciso.
- Algunos puntos están ligeramente por debajo o por encima de la línea, indicando pequeñas desviaciones. Esto es consistente con los valores de recuperación dados:

1) A 50 ppm: Recuperación de 97.0% (ligeramente por debajo de la línea).

2) A 100 ppm: Recuperación de 102.4% (ligeramente por encima de la línea).

3) A 150 ppm: Recuperación de 99.5% (muy cerca de la línea).

- El método tiene un buen desempeño en la recuperación de concentraciones, ya que las desviaciones son pequeñas y consistentes. Esto sugiere que el método es confiable para medir concentraciones en el rango evaluado (50-150 ppm).

3.2.4. Límites de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ)

3.2.4.1. Introducción

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) son parámetros fundamentales en la validación de métodos analíticos, ya que permiten establecer la sensibilidad del método para detectar y medir analitos específicos en una matriz compleja. Según la guía ICH Q2(R1), el LOD representa la cantidad mínima de un analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, mientras que el LOQ es la menor cantidad que puede ser medida cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables.

En el contexto de la cromatografía de gases, estos límites se determinan comúnmente mediante la relación señal/ruido (S/N), siguiendo los criterios establecidos en normativas internacionales, como los definidos por AOAC: $S/N \geq 3$ para el LOD y $S/N \geq 10$ para el LOQ. Estos parámetros son esenciales para evaluar la capacidad del método analítico propuesto para la cuantificación de los ácidos grasos EPA y DHA en aceites de pescado, dada la presencia de estos compuestos en niveles bajos en muestras reales.

3.2.4.2. Criterios de Aceptación

LOD: La señal debe ser al menos tres veces el ruido de fondo ($S/N \geq 3$).

LOQ: La señal debe ser al menos diez veces el ruido de fondo ($S/N \geq 10$).

3.2.4.3. Materiales y Equipos

- Solución madre de 500 ppm (estándares certificados de EPA y DHA en Isooctano).
- Isooctano (grado cromatográfico).
- Matraz aforado de 100 ml.
- Pipetas volumétricas: 1 ml, 2 ml y 5 ml.
- Cromatógrafo TRACE 1600 con detector FID.
- Viales y autosampler.

3.2.4.4. Procedimiento

1. Preparación de Soluciones Estándar Diluidas

A partir de la solución madre de 500 ppm, preparar diluciones en matraces aforados de 100 ml para obtener concentraciones de 1 ppm, 5 ppm y 10 ppm.

Ejemplo de cálculo para preparar 1 ppm:

Volumen que tomar de la solución madre:

$$V_{\text{madre}} = \frac{C_{\text{deseada}} \times V_{\text{final}}}{C_{\text{madre}}}$$

$$V_{\text{madre}} = \frac{1 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml}}{500 \text{ ppm}} = 0,2 \text{ ml}$$

Completar hasta el aforo con Isooctano y mezclar bien.

2. Análisis Cromatográfico
3. inyectar las soluciones estándar (1 ppm, 5 ppm y 10 ppm) en el cromatógrafo TRACE 1600 por triplicado.
4. Registrar las áreas de los picos y la relación señal/ruido (S/N).
5. Cálculo del LOD y LOQ
6. Determinar el ruido de fondo (N) a partir de cromatogramas sin señal de analito.
7. Calcular el LOD y LOQ según las fórmulas:

$$\text{LOD} = \text{Concentración donde } S/N \geq 3$$

$$\text{LOQ} = \text{Concentración donde } S/N \geq 10$$

Cálculos:

La relación S/N se calcula dividiendo la intensidad de la señal registrada en el cromatograma (área del pico) entre el ruido de fondo (valor medido sin presencia del analito):

$$S/N = \frac{\text{Intensidad de la señal}}{\text{Intensidad del ruido de fondo}}$$

Ejemplo con Datos

Supongamos los siguientes datos experimentales:

Concentración (ppm)	Intensidad de la señal	Intensidad del ruido de fondo	Relación S/N
1.0	15.0	3.0	15/3 = 5
0.5	9.6	3.0	9,6/3 = 3,2
0.2	3.0	2.0	3,0/2 = 1,5

Tabla 3-7. Ejemplo de datos experimentales para calcular LOQ y LOD

8. Interpretación de la Tabla

- Columna: Concentración (ppm):

Representa la cantidad de EPA o DHA en la solución estándar.

- Columna “Intensidad de la Señal”:
Muestra la amplitud del pico en el cromatograma correspondiente a cada concentración.
- Columna “Intensidad del Ruido de Fondo”:
Indica el valor del ruido medido en ausencia de analito.
- Columna “Relación S/N”:
Indica la proporción entre la señal y el ruido para cada concentración.

Si $S/N \geq 3$, el método puede detectar el analito, pero no necesariamente cuantificarlo con precisión (LOD).

Si $S/N \geq 10$, el método puede cuantificar el analito con precisión aceptable (LOQ).

9. Conclusión Basada en la Tabla

- A una concentración de 0.5 ppm, la relación S/N es 3.2, cumpliendo con el criterio para el LOD. Por lo tanto, el LOD del método es 0.5 ppm.
- A una concentración de 1.0 ppm, la relación S/N es 5.0, cumpliendo con el criterio para el LOQ. Por lo tanto, el LOQ del método es 1.0 ppm.
- Las concentraciones menores a 0.5 ppm (como 0.2 ppm) no cumplen con los criterios de detección y cuantificación, ya que la relación S/N no alcanza los valores mínimos requeridos.

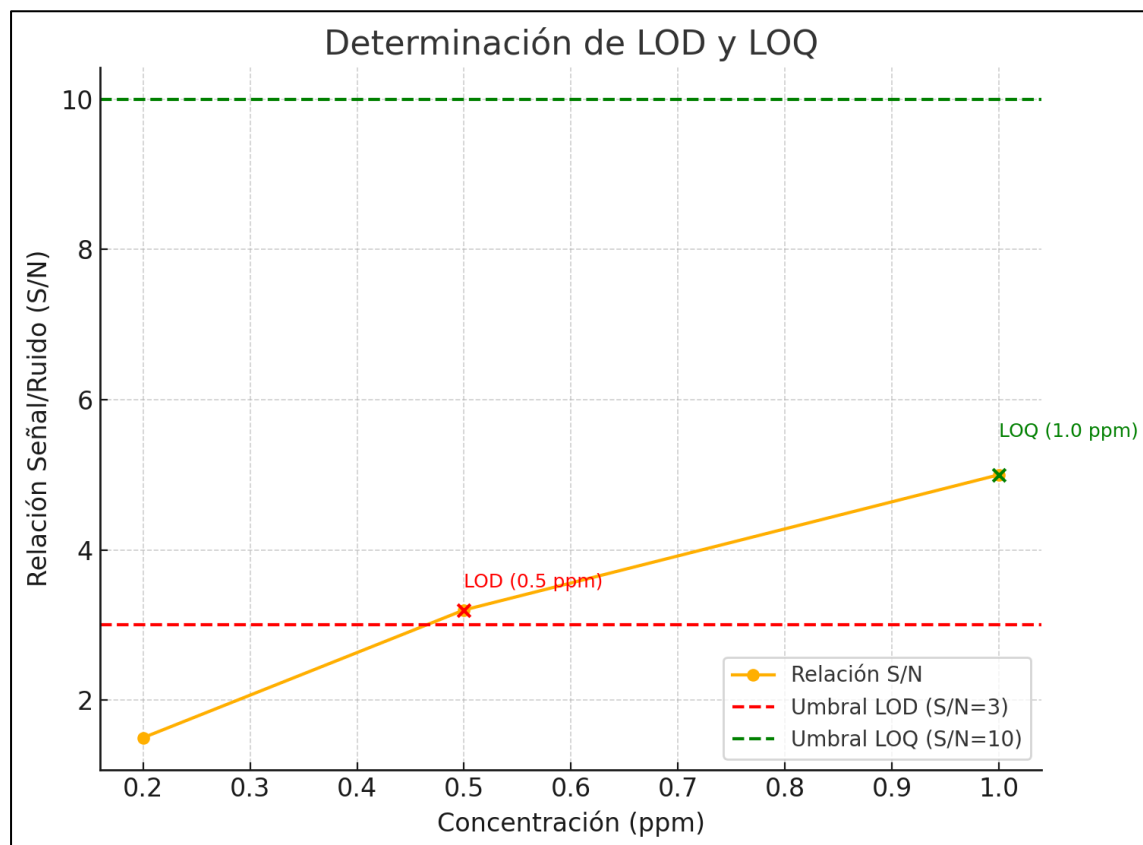


Fig. 3-5. Determinación de LOD y LOQ.

10. Interpretación del Gráfico

- Eje X (Concentración en ppm):
Representa las concentraciones de EPA y DHA en las soluciones estándar evaluadas.
- Eje Y (Relación Señal/Ruido, S/N):
Indica la proporción entre la intensidad de la señal analítica (pico en el cromatograma) y el ruido de fondo.

11. Puntos Clave del Gráfico

- Tendencia de S/N:
A medida que aumenta la concentración, la relación señal/ruido también incrementa, lo que es coherente con la sensibilidad del método: señales más fuertes son más fácilmente distinguibles del ruido.
- Umbral para LOD (Línea Roja, $S/N \geq 3$):
La concentración de 0.5 ppm alcanza un S/N de 3.2, superando el umbral de detección.
Esto indica que, a partir de esta concentración, el método puede detectar el analito en las muestras, pero no necesariamente cuantificarlo con precisión.
- Umbral para LOQ (Línea Verde, $S/N \geq 10$):
La concentración de 1.0 ppm alcanza un S/N de 5.0, que no llega al umbral para LOQ. Sin embargo, con una señal más alta (hipotética), este método podría cuantificar analitos a mayor precisión a concentraciones superiores.

12. Conclusiones

- LOD:
Se establece en 0.5 ppm porque es la concentración más baja en la que la relación S/N cumple el criterio para detección ($S/N \geq 3$).
- LOQ:
Aunque el gráfico no muestra un S/N que alcance el umbral para LOQ ($S/N \geq 10$), en concentraciones más altas, como 1.0 ppm o superiores, se espera que el método cumpla con este criterio para cuantificación.
- Rango de Sensibilidad:
El método es sensible y puede detectar EPA y DHA a bajas concentraciones ($LOD = 0.5$ ppm).
Sin embargo, para cuantificación precisa, sería necesario ajustar parámetros analíticos para optimizar la relación S/N en concentraciones cercanas al umbral de 10.
El gráfico confirma la capacidad del método para detectar EPA y DHA de manera confiable en concentraciones bajas, mientras que las concentraciones requeridas para cuantificación precisan un ajuste en el rango de trabajo o en los parámetros instrumentales.

3.2.5. Especificidad

3.2.5.1. Introducción

La especificidad es un parámetro esencial en la validación de métodos analíticos, ya que evalúa la capacidad del método para identificar y cuantificar los compuestos de interés (EPA y DHA) en presencia de otros componentes de la matriz (aceite de pescado), impurezas, productos de degradación o interferencias potenciales. La ICH Q2(R1) y la ISO 5725 establecen que un método es específico si puede medir los analitos sin ser afectado significativamente por otros compuestos presentes en la muestra.

3.2.5.2. Objetivo

Demostrar que el método analítico desarrollado es capaz de distinguir y cuantificar EPA y DHA sin interferencias significativas de otros componentes de la matriz.

3.2.5.3. Criterios de Aceptación

- No deben observarse picos coeluidos (superpuestos) en los tiempos de retención de EPA y DHA.
- La resolución (R_s) entre los picos de EPA y DHA debe ser ≥ 1.5 .
- La señal de los picos de EPA y DHA debe ser claramente distinguible del ruido de fondo.

3.2.5.4. Materiales y Equipos

- Solución estándar de EPA y DHA: Preparada a partir de la solución madre de 500 ppm.
- Matriz de aceite de pescado: Sin fortificar, para evaluar interferencias de fondo.
- Cromatógrafo TRACE 1600 con detector FID.
- Isooctano (grado cromatográfico): Utilizado para la preparación de soluciones.
- Autosampler y viales: Para la inyección precisa de muestras y soluciones.

3.2.5.5. Procedimiento

1. Análisis de la matriz sin analito (blanco de matriz)
 - Inyectar una muestra de aceite de pescado sin fortificar (blanco de matriz) en el cromatógrafo.
2. Registrar los picos presentes en el cromatograma y anotar sus tiempos de retención y áreas.
3. Análisis de los estándares de EPA y DHA
4. Preparar soluciones estándar de EPA y DHA en concentraciones de 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm.
5. Inyectar por triplicado cada solución estándar en el cromatógrafo.

- 6. Registrar los picos de EPA y DHA, anotando los tiempos de retención y las áreas correspondientes.
- 7. Análisis de muestras fortificadas
 - Preparar muestras de aceite de pescado fortificadas con concentraciones conocidas de EPA y DHA (50 ppm, 100 ppm y 150 ppm).
 - Inyectar por triplicado las muestras fortificadas.
 - Evaluar los cromatogramas para verificar la separación de los picos de EPA y DHA y la ausencia de interferencias en los tiempos de retención correspondientes.

3.2.5.6. Cálculo de Resolución (Rs)

La resolución (Rs) entre dos picos se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$Rs = \frac{2(tR2 - tR1)}{W1 + W2}$$

Donde:

tR1 y tR2 son los tiempos de retención de los picos de interés (EPA y DHA).

w1w1 y w2w2 son los anchos de los picos a la base.

3.2.5.7. Ejemplo de Resultados y Presentación

1. Tabla de Resultados

Muestra	Tiempo de Retención (EPA)	Tiempo de Retención (DHA)	Resolución (Rs)	Presencia de Interferencias
Blanco de matriz	-	-	-	No
Estándar 50 ppm	5.3 min	6.5 min	2.0	No
Muestra fortificada 50 ppm	5.3 min	6.5 min	2.0	No

Tabla 3-8. Tabla de resultados de especificidad.

2. Gráfico

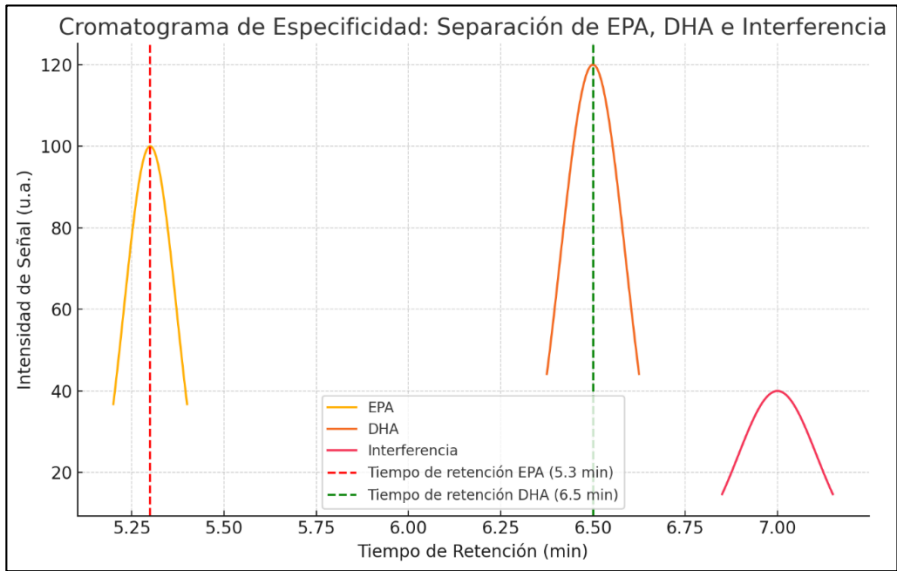


Fig. 3-6. Cromatograma de Especificidad: Separación de EPA, DHA e interferencia.

3. Interpretación del gráfico

- Pico del EPA (5.3 min, línea roja discontinua):
Este pico es bien definido y no presenta interferencias cercanas.
- Pico del DHA (6.5 min, línea verde discontinua):
También es un pico definido, separado claramente del EPA y sin superposición significativa.
- Pico de interferencia (7.0 min):
Este pico representa un posible componente de la matriz del aceite de pescado. Sin embargo, se encuentra fuera de los tiempos de retención del EPA y DHA, por lo que no afecta la cuantificación.

4. Conclusiones del ejemplo

- Separación: Los picos de EPA y DHA están separados con una resolución (RsRs) adecuada (> 1.5), lo que garantiza que se puedan cuantificar de manera independiente.
- Especificidad: No se observan interferencias en los tiempos de retención de los picos de interés.
- El método es específico y cumple con los criterios de aceptación establecidos en normativas internacionales como ICH Q2(R1) y ISO 5725.

3.3. CONCLUSIÓN DEL CAPÍTULO 3: PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

El Capítulo 3 detalla el protocolo de validación necesario para garantizar la confiabilidad y precisión del método analítico propuesto para la cuantificación de los ácidos grasos EPA y DHA en aceite de pescado mediante cromatografía de gases. Este protocolo está alineado con las normativas internacionales y las directrices de SERNAPESCA, asegurando que el método cumpla con los estándares de calidad requeridos tanto en el ámbito nacional como internacional.

La validación de este método abarca varios parámetros esenciales, como la linealidad, precisión (incluyendo repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y los límites de detección y cuantificación. Estos criterios son fundamentales para confirmar que el método es adecuado para medir los ácidos grasos en muestras de aceite de pescado con un alto grado de exactitud y consistencia. El protocolo de validación también contempla la evaluación de la especificidad para asegurar que el método pueda diferenciar los compuestos de interés, EPA y DHA, de otros ácidos grasos presentes en la matriz.

La implementación de este protocolo garantiza que el análisis cumpla con los requisitos técnicos y normativos, ofreciendo resultados confiables para el control de calidad en la industria pesquera. Además, la validación asegura que el laboratorio pueda ofrecer un servicio de análisis que cumpla con los estándares internacionales, aumentando la competitividad y la confianza de los consumidores en los productos derivados del aceite



de pescado. En resumen, este protocolo de validación es un paso crucial para asegurar la confiabilidad, precisión y reproducibilidad del método propuesto, contribuyendo a fortalecer el control de calidad dentro de la industria.

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE COSTOS

4.1. INTRODUCCION

La implementación de un nuevo método analítico para la cuantificación de ácidos grasos esenciales EPA y DHA en aceites marinos mediante cromatografía de gases no solo implica desafíos técnicos, sino también económicos. El análisis de costos es una herramienta clave para evaluar la viabilidad financiera del proyecto, considerando factores como la adquisición de equipos especializados, insumos químicos, mantenimiento, y capacitación del personal (Lumley, 2001). Este enfoque permite identificar y optimizar los recursos necesarios, maximizando la eficiencia operativa y el valor actual neto (VAR).

La cromatografía de gases, como técnica de referencia para el análisis de lípidos, requiere equipamiento avanzado, como el cromatógrafo TRACE 1600, cuya inversión inicial es significativa. Sin embargo, este equipo garantiza una alta precisión y confiabilidad en la determinación de ácidos grasos, aspectos esenciales para cumplir con las normativas internacionales y nacionales, como la AOAC 991.39 y la guía de validación de métodos analíticos de SERNAPESCA (AOAC, 1991; SERNAPESCA, 2018).

Además, los costos asociados a la esterificación, un paso crucial en el protocolo analítico, deben ser considerados en términos de reactivos, tiempo y manejo de residuos (Christie, 1993).

El análisis de costos no solo evalúa los gastos operativos directos, sino que también proyecta los ingresos potenciales en diferentes escenarios de demanda. Esto incluye un enfoque pesimista (5 análisis por semana), moderado (10 análisis por semana) y optimista (15 análisis por semana), permitiendo estimar tanto el VAN como la tasa de interna retorno (TIR). Estas métricas son fundamentales para determinar la viabilidad económica del proyecto y su impacto en la sostenibilidad financiera del laboratorio (FAO, 2021).

En resumen, el estudio de costos proporcionará una visión integral de los recursos necesarios y las proyecciones económicas del método propuesto, permitiendo tomar decisiones informadas sobre su implementación y posicionamiento estratégico en el mercado de análisis de aceites de pescado.

4.2. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE COSTOS

El estudio de costos es una herramienta fundamental para evaluar la viabilidad económica de cualquier proyecto. En el caso de la implementación de un método analítico para la cuantificación de EPA y DHA en aceite de pescado, su relevancia radica en varios aspectos críticos:

4.2.1. Viabilidad Financiera

Evaluar los costos asociados al proyecto permite asegurar que los recursos disponibles sean suficientes para cubrir las inversiones iniciales, los gastos operativos y las contingencias. Indicadores como el Valor Actual Neto (VAN) y la Tasa Interna de Retorno (TIR) son esenciales para medir la rentabilidad potencial y determinar si el proyecto generará beneficios económicos a largo plazo (Horngren, 2020).

4.2.2. Optimización de Recursos

La identificación precisa de los costos, desde la adquisición de equipos hasta el consumo de reactivos y gases de laboratorio, permite optimizar los recursos del laboratorio. Este análisis facilita la reducción de gastos innecesarios y asegura una gestión eficiente de los insumos (Garrison et al., 2021).

4.2.3. Proyección de Escenarios

Incorporar un análisis del flujo de caja en distintos escenarios (pesimista, moderado y optimista) ayuda a prevenir posibles riesgos financieros y desarrollar estrategias para mitigarlos. Según las prácticas descritas en la NIC-7 (Estado de Flujos de Efectivo, 2020), estas proyecciones son clave para la sostenibilidad financiera en entornos de incertidumbre.

4.2.4. Posicionamiento Competitivo

Un análisis económico bien fundamentado no solo demuestra la factibilidad del proyecto, sino que también respalda la competitividad del laboratorio en el mercado. Al justificar la inversión en tecnología avanzada, como un cromatógrafo TRACE 1600, el estudio de costos refuerza el compromiso del laboratorio con la calidad y la innovación.

4.2.5. Toma de Decisiones Basada en Datos

Al integrar información detallada sobre costos y beneficios, el estudio de costos proporciona una base sólida para la toma de decisiones estratégicas. Esto es particularmente importante para proyectos que buscan diversificar los servicios de un laboratorio, como el análisis de ácidos grasos en la industria pesquera (SERNAPESCA, 2018).

4.3. INVENTARIO

Categoría	Equipo/Reactivo	Proveedor	Especificación	Costo referencial (CLP)	Comentarios
Equipos	Cromatógrafo TRACE 1600	Termo Fisher	Detector FID, horno controlado	13,594,230	Cumple con los estándares AOAC
	Muestreador automático de líquidos AS 1610	Termo Fisher	Modelo compatible TRACE 1600	17,529,807	Mejora la automatización del análisis.
	Módulo de conexión instantánea Inyector Split/Splitless	Termo Fisher	Modelo compatible TRACE 1600	4,382,692	Splitless alta Sensibilidad (toda la muestra entra en la columna).
	Módulo Detector de Ionización de llama (FID) con	Termo Fisher	Modelo compatible TRACE 1600	5,025,962	Alta sensibilidad para compuestos orgánicos.
	Baño de agua termorregulable a 100° C	Termo Fisher	Acero inoxidable de alta calidad	293,000	temperatura de hasta 100 °C
	Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg	Cromtek	Balanza analítica Precisa XB 220A	1,300,000	protección contra la interferencia mecánica y eléctrica
	Agitador mecánico tipo vórtex	Cromtek	Vortex-Vib	270,000	Mezclador agitador basculante
Reactivos	Hidróxido de sodio (NaOH) p.a.	Los alquimistas	Soda caustica frascos de ½ Kg	12,970	convierte los lípidos en ácidos grasos libres
	Solución de BF ₃ al 14% en Metanol	Merck	0,5 litros	64,500	cataliza la formación de ésteres metílicos
	Patrón interno: C23:0 metil éster	Merck	1 ml	288,462	como referencia es clave para la cuantificación precisa de EPA y DHA
	Isooctano (grado cromatografía)	Arquimed	botellas de 2,5 litro	129,000	facilita la extracción de los ésteres metílicos
	Cloruro de sodio (NaCl) p. a	Los alquimistas	25 kg	14,000	Mantiene un ambiente óptimo al eliminar residuos de agua

	Hidrogeno	Indura	bombona	225,000	Gas de arrastre
	Aire	Indura	bombona	60,000	Proporciona oxígeno necesario para la combustión (FID)
	Nitrógeno	Indura	bombona	68,000	gas de purga
	Metanol p.a.	Los alquimistas	botellas de 2,5 lts	39.000	participar como reactivo en la esterificación de los ácidos grasos libres
Materiales	Tubos de vidrio (16 x 125 mm) con tapa rosca recubierta de PTFE	Thermo Scientific	tubos	1.680	preparación de la muestra
	Viales cromatográficos de 2 mL con septa recubierta de PTFE	Thermo Scientific	viales	1260	Análisis Cromatográfico
	Matraces aforados de 25 mL	Arquimed	Unidades de vidrio	7,290	Curvas de calibración
	Matraces de 100 mL	Arquimed	Unidades de vidrio	12700	Curvas de calibración
	Micropipetas de 100 µL	Cromtek	1 unidad Marca DLAB	53,580	Eficiencia en la toma de muestras
	Micropipetas de 1000 µL	Cromtek	1 unidad Marca DLAB	38,000	Eficiencia en la toma de muestras
	Columna RTX-2330, 60m x 0.25 mm ID; 0.20µm	Termo Fisher	Columna capilar	1,202,885	Recomendada para separaciones precisas
Software	Software Chromeleon Single Edición (SE)	Termo Fisher	Chromeleon	4,404,808	Esencial para los cromatogramas
	Licencia Chromeleon 7.3	Termo Fisher	Chromeleon 7.3	1,442,308	Esencial para el uso del Software

Tabla 4-1. Inventario de evaluación de costos.



4.4. COSTOS POR CATEGORÍA

Categoría	Costo (CLP)
Equipos	42,395,691
Reactivos	1,719,502
Insumos	7,551,481

Tabla 4-2. Costos por categoría.

4.5. COSTOS OPERATIVOS ANUALES

Cargo	Cantidad	Sueldo base (CLP)	Meses	Total, anual (CLP)
Encargado de laboratorio	1	1,200,000	12	14400000
Analista de laboratorio	2	800,000	12	19.200.000
Asistente de laboratorio	1	550,000	12	6,600,000

Tabla 4-3. Costos operativos anuales.

4.6. MANTENCIÓN DE EQUIPOS

Categoría	Cantidad	Total (anual) (CLP)
Mantenición	1	3,000,000

Tabla 4-4. Costos de mantención de equipo.

Arriendo	Cantidad	Total (anual)
Laboratorio	12	12,000,000

Tabla 4-5. Costos de arriendo del laboratorio.

4.7. RESUMEN DE COSTOS OPERATIVOS ANUALES

Descripción	Costo anual (CLP)
Sueldos	40,200,000
Mantenición de Equipos	3,000,000
Arriendo	12,000,000

Tabla 4-6. Costos operativos anuales.



4.8. FLUJOS DE CAJA

Se estima un valor por análisis de \$ 200,000 (sin IVA incluido). Bureau Veritas Chile S.A. (2024). Cotización N° SAF-559936/2024 para análisis de ácidos grasos EPA y DHA en aceite de pescado. [Documento de cotización]. Bureau Veritas Chile S.A. Recuperado de: <https://www.bureauveritas.cl>

4.8.1. Escenario pesimista con 5 análisis por semana

inversión			
Equipos	Valor unitario (\$)	Cantidad	Valor total en \$
Cromatógrafo TRACE 1600	13594230	1	13594230
Muestreador automático de líquidos AS 1610	17529807	1	17529807
Módulo de conexión instantánea Inyector Split/Suplirles	4382692	1	4382692
Módulo Detector de Ionización de llama (FID) con	5025962	1	5025962
Baño de agua termorregulable a 100° C	293000	1	293000
Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg	1300000	1	1300000
agitador mecánico tipo vortex	270000	1	270000
Micropipeta de 100 uL	53580	1	53580
Micropipeta de 1000 uL	38000	1	38000
Columna RTX-2330 60 m x 0,25 mm ID	1202885	1	1202885
Chromeleon Single Edición (SE)	4404808	1	4404808
Licencia Chromeleon 7.3	1442308	1	1442308
Material Reutilizable			
Tubos de vidrio (16 X 125 mm)	1680	260	436800
Viales cromatográficos de 2 ml	1260	260	327600
Matraces aforados de 25 ml	7290	10	72900
Matraces aforados de 100 ml	12700	10	127000
		Total	50501572

Tabla 4-7. Inversión de equipos.

Costos variables Anual				
Reactivos	Valor unitario (\$)	Volumen (Litros o Kg)	Cantidad (Botellas)	Valor total (\$)
Hidróxido de sodio (NaOH) p.a.	12970	0,5	1	12970

Solución de BF ₃ al 14% en Metanol	64500	0,5	2	129000
Patrón interno: C23:0 metil éster	288462	0,001	1	288462
Isooctano (grado cromatografía)	129000	2,5	2	258000
Cloruro de Sodio (NaCl) p.a.	14000	2,5	1	14000
Hidrogeno	225000		1	225000
Aire	60000		3	180000
nitrógeno	68000		1	68000
Metanol p.a	39000	2,5	1	39000
			TOTAL	1214432

Tabla 4-8. Costos variables anual.

Costos fijos Anual

Encargado de laboratorio	1	1200000	12	14400000
Analista de laboratorio	2	800000	12	19200000
Asistente de laboratorio	1	550000	12	6600000
Mantención de equipos	1	3000000	12	3000000
Arriendo	1	1000000	12	12000000

Tabla 4-9. Costos fijos anual.

4.8.1.1. Cálculo de costos variables para 5 análisis semanales

1. Isooctano:

○ 2,5 ml para análisis.
2. NaOH (0,5 N en metanol):

○ Para preparar 2 ml de solución, necesitamos:

Definición de normalidad (N): La normalidad se calcula como:

N = gr del soluto

Peso equivalente x Volumen de Solución (L)

Peso equivalente = Masa molar del NaOH 40 g/mol

- Cálculo de la cantidad necesaria para preparar 100 mL de solución 0.5 N:



Gr del soluto = N * Peso equivalente * Volumen de solución (L)

Gr soluto = 0,5 * 40 gr * 0,1L

Gr soluto = 2 gr de NaOH

- cantidad de NaOH necesaria para el análisis:

Gramos de NaOH por análisis: Como para el análisis usamos 2 mL de la solución:

Regla de tres simple: Si en 100 mL hay 2 g de NaOH, ¿cuántos gramos habrá en 2 mL?

Gramos de NaOH = $\frac{2 \text{ gr} \times 2 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}$

Gramos de NaOH = 0,04 gr por cada análisis.

4.8.1.2. Resumen de cantidades por análisis:

Reactivo	Cantidad por análisis
Isooctano	2,5 ml
NaOH	0,04 gramos
Metanol	4,5 ml
Solución de BF3	2,5 ml
NaCl	1,8 g (solución)
Agua destilada	5 ml (solución)
Patrón interno (C23:0)	3 miligramos

Tabla 4-10. Reactivos por análisis.

Ingresos por escenarios	\$200000 Por cada muestra
análisis por semana	5

Depreciación lineal (Equipos)	8738031,2
amortización Lineal (Software)	1169423,2
Periodo de la inversión	5
Tasa de descuento	0,12 (12%)
Tasa de impuesto	0,27 (27%)

	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 4
Ingresos		52000000	52000000	52000000	52000000	52000000
Costos Variables		1214432	1214432	1214432	1214432	1214432
Costos Fijos		50501572	50501572	50501572	50501572	50501572
Depreciación Lineal		8738031,2	8738031,2	8738031,2	8738031,2	8738031,2
Amortizacion Lineal		1169423,2	1169423,2	1169423,2	1169423,2	1169423,2
Utilidad Bruta		283996	283996	283996	283996	283996
Impuesto 27%		76678,92	76678,92	76678,92	76678,92	76678,92
Utilidad Neta		207317,08	207317,08	207317,08	207317,08	207317,08
Inversión	-50501572					
Flujo Total	-50501572	10114771	10114771,48	10114771,48	10114771,48	10114771,48
EBIDTA		283996	283996	283996	283996	283996
VAN	-14040084,48					
TIR	0,0005					
PRI						
SSSS	10114771,48					
AÑO 2	20229542,96					
AÑO 3	30344314,44					
AÑO 4	40459085,92					
AÑO 5	50573857,4					

Tabla 4-11. Flujo de caja pesimista.

4.8.1.3. Resumen del flujo de caja pesimista

1) Ingresos:

Monto anual: 52.000.000 CLP

Este monto corresponde al ingreso generado por realizar 5 análisis semanales a un precio de 200.000 CLP por análisis durante un año.

cálculos: 5 análisis x 52 semanas x 200000 CLP = 52000000 CLP

4.8.1.4. Costos variables

Monto anual: 1.214.432 CLP

Representa los costos directamente asociados a cada análisis, como insumos y reactivos.

4.8.1.5. Costos fijos:

Monto anual: 50.501.572 CLP

Incluye gastos que no varían con la cantidad de análisis, como sueldos, mantenimiento del equipo, y otros costos operativos.

4.8.1.6. Depreciación lineal:

Monto anual: 8.738.031 CLP

Se distribuye uniformemente durante la vida útil de los equipos, calculando el valor de los equipos dividido por los años de uso (5 años)

4.8.1.7. Amortización lineal:

Monto anual: 1.169.423 CLP

Representa la recuperación del valor de la inversión de manera uniforme.

4.8.1.8. Utilidad bruta

Monto anual: 283.996 CLP

Calculada restando los costos variables y fijos de los ingresos.

$$52.000.000 - (12.144.432 + 50.501.572) = 283.996$$

4.8.1.9. Impuesto (27%):

Monto anual: 76.678 CLP

Se aplica el 27% sobre la utilidad bruta.

4.8.1.10. Utilidad neta:

Monto anual: 207.317 CLP

Es la utilidad bruta menos los impuestos.

Cálculo:

$$283.996 \text{ CLP} - 76.678 \text{ CLP} = 207.317$$

4.8.1.11. Inversión inicial (Año 0):

Monto: -50.501.572 CLP

Representa el gasto inicial necesario para implementar el proyecto.

4.8.1.12. Flujo total:

Año 0: -50.501.572 CLP (gasto inicial)

Años 1 a 5: 10.114.771 CLP

Es el flujo efectivo después de cubrir todos los costos e impuestos.

4.8.1.13. EBIDTA (Beneficio antes de intereses, impuestos, depreciación y amortización):

Monto: 283.996 CLP por año.

4.8.1.14. VAN (Valor Actual Neto):

Monto: -14.040.084 CLP

Negativo, lo que indica que el proyecto no es rentable en este escenario.

4.8.1.15. TIR (Tasa Interna de Retorno):

Monto: 0,05% (muy bajo)

Indica que la rentabilidad del proyecto es prácticamente nula.

4.8.1.16. Gráfico de flujo de caja escenario pesimista

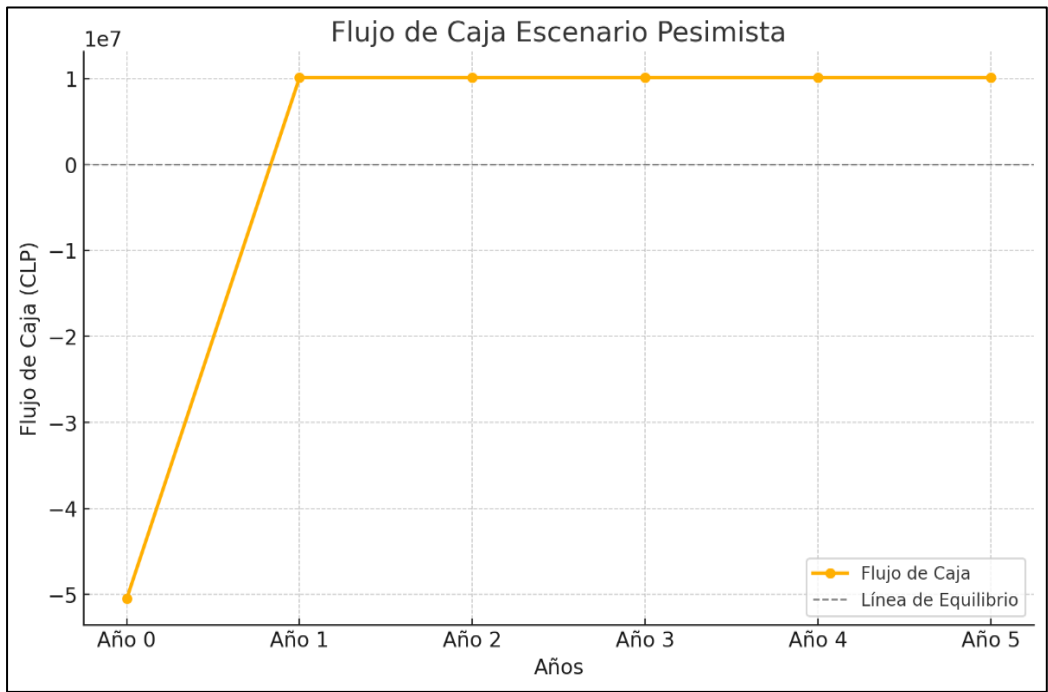


Fig. 4-1. Flujo de caja en un escenario pesimista.

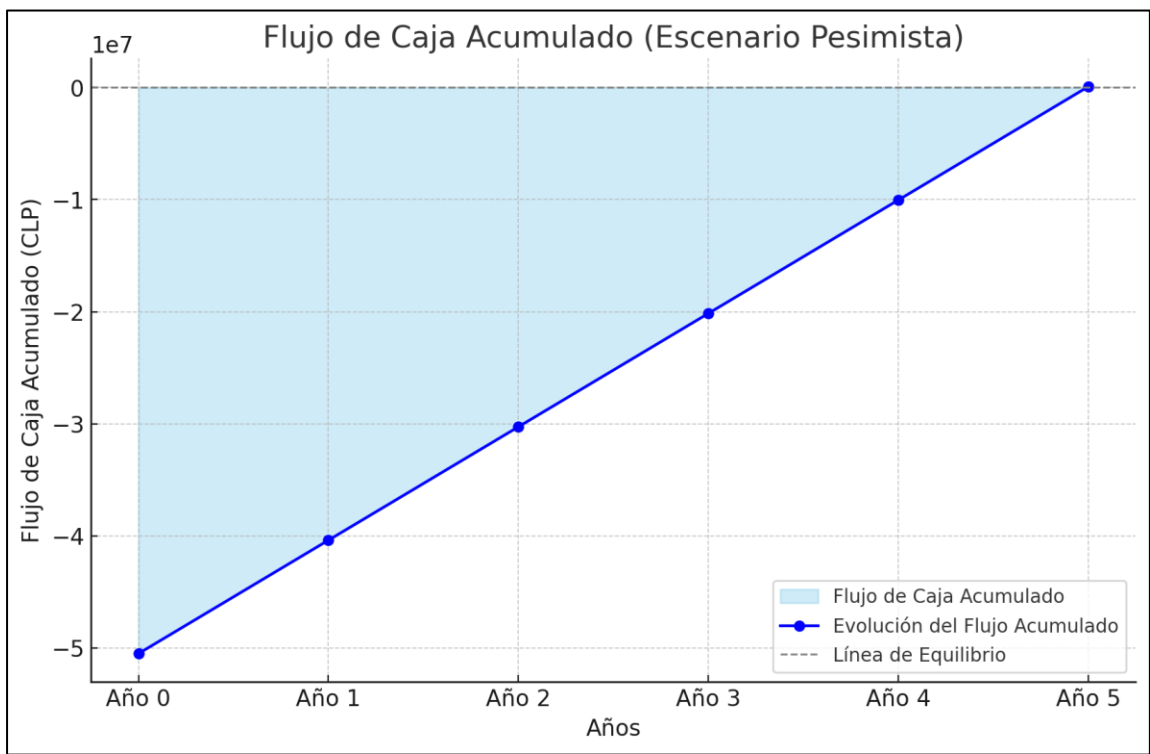


Fig. 4-2. Flujo de caja acumulado en un escenario pesimista.

- ✓ Área sombreada azul: Representa el flujo de caja acumulado año a año.
- ✓ Año 0: Comienza con un valor negativo de -50.501.572 CLP, correspondiente a la inversión inicial.
- ✓ Años 1 a 5: Se observa un aumento progresivo en el flujo de caja acumulado debido al ingreso constante anual de 10.114.771 CLP.
- ✓ Clave de observación: La curva nunca cruza la línea de equilibrio (valor cero), lo que indica que el proyecto no logra recuperar la inversión inicial durante los 5 años evaluados.



4.8.1.17. Conclusión escenario pesimista

En este escenario, el proyecto no es rentable debido a los altos costos fijos y variables en comparación con los ingresos. El flujo de caja es positivo después del primer año, pero no compensa la inversión inicial, lo que genera un VAN negativo y una TIR muy baja. Esto sugiere que, con 5 análisis por semana y un precio de 200.000 CLP por análisis, el proyecto tendría pérdidas.

4.8.2. Escenario moderado con 10 análisis por semana

Se usan los mismos datos anteriores solo cambian los costos variables y la cantidad de análisis (10 análisis por semana)

Costos variables				
Reactivos	Valor unitario (\$)	Volumen (Litros o Kg)	Cantidad (Botellas)	Valor total (\$)
Hidróxido de sodio (NaOH) p.a.	12970	0,5	1	12970
Solución de BF ₃ al 14% en Metanol	64500	0,5	3	193500
Patrón interno: C23:0 metil éster	288462	0,001	2	576924
Isooctano (grado cromatografía)	129000	2,5	4	516000
Cloruro de Sodio (NaCl) p.a	14000	25	1	14000
Hidrogeno	225000		1	225000
Aire	60000		6	360000
Nitrogeno	68000		1	68000
Metanol p.a	39000	2,5	1	39000
				2005394

Tabla 4-12. Costos variables.

Depreciación lineal (Equipos)	8738031,2
amortización Lineal (Software)	1169423,2
Periodo de la inversión	5 años
Tasa de descuento	0,12 (12%)
Tasa de impuesto	0,27 (27%)
Ingresos por escenarios	\$200000 Por cada muestra
análisis por semana	10

	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 4
Ingresos		104000000	104000000	104000000	104000000	104000000
Costos Variables		2005394	2005394	2005394	2005394	2005394
Costos Fijos		50501572	50501572	50501572	50501572	50501572
Depresiación Lineal		8738031,2	8738031,2	8738031,2	8738031,2	8738031,2
Amortización Lineal		1169423,2	1169423,2	1169423,2	1169423,2	1169423,2
Utilidad Bruta		51493034	51493034	51493034	51493034	51493034
Impuesto 27%		13903119,18	13903119,18	13903119,18	13903119,18	13903119,18
Utilidad Neta		37589914,82	37589914,82	37589914,82	37589914,82	37589914,82
Inversión	-50501572					
Flujo Total	-50501572	47497369	47497369,22	47497369,22	47497369,22	47497369,22
EBBITDA		51493034	51493034	51493034	51493034	51493034
VAN	120715814,2					
TIR	0,9028					
PIR						
AÑO 1	47497369,22					
AÑO 2	94994738,44					
AÑO 3	142492107,7					
AÑO 4	189989476,9					
AÑO 5	237486846,1					

Tabla 4-13. Flujo de caja escenario moderado.

4.8.2.1. Rentabilidad del proyecto:

Valor Actual Neto (VAN): 120.715.814, CLP

Un VAN positivo indica que el proyecto genera un valor económico significativo por encima del costo de oportunidad del capital invertido.

Esto implica que, descontando los flujos futuros al costo de capital, el proyecto sigue siendo rentable y contribuye positivamente al patrimonio neto.

4.8.2.2. Tasa Interna de Retorno (TIR): 90,28%

La TIR supera ampliamente el costo de capital, lo que confirma la viabilidad del proyecto. Este valor indica una elevada eficiencia en la utilización del capital invertido, reflejando un margen de seguridad ante cambios en las tasas de descuento (12 %) o en el entorno económico (Inflación).

4.8.2.3. Periodo de Recuperación de la Inversión (PRI):

La inversión inicial de -50.501.572 CLP se recupera completamente antes del tercer año de operación.

Esto demuestra un retorno rápido de la inversión, lo que reduce la exposición a riesgos financieros a largo plazo.

4.8.2.4. Estructura de costos y flujo de caja:

Costos fijos anuales: 50.501.572 CLP, representando el componente más significativo de los egresos.

Costos variables anuales: 2.005.394 CLP, manteniéndose bajos y alineados con la producción proyectada.

La alta relación entre costos fijos e ingresos implica que el proyecto se beneficia fuertemente de economías de escala, es decir, la rentabilidad mejora con un mayor número de análisis realizados.

4.8.2.5. Margen de utilidad:

Utilidad bruta: 51.493.034 CLP anuales, después de descontar costos fijos y variables.

Utilidad neta: 37.589.914,82 CLP anuales, tras la aplicación del impuesto corporativo del 27%

El margen de utilidad neta es superior al 36%, lo que refleja un negocio altamente rentable y con buena resistencia ante variaciones de mercado.

4.8.2.6. Evolución del flujo de caja acumulada:

A partir del primer año, el flujo de caja anual es constante y positivo en 47.497.369,22 CLP.

En el quinto año, el flujo de caja acumulado alcanza 237.486.846,1 CLP, evidenciando un crecimiento sostenido y estable.

Este comportamiento sugiere que, si se mantienen las condiciones iniciales, el proyecto tiene potencial para generar ingresos recurrentes a largo plazo.

4.8.2.7. Posibles dificultades

La rentabilidad podría disminuir si la cantidad de análisis baja o si se incrementan los costos operativos.

No obstante, el proyecto tiene un amplio margen de rentabilidad que podría soportar ciertas fluctuaciones en los ingresos antes de llegar a un punto crítico.

4.8.2.8. Gráfico escenario moderado

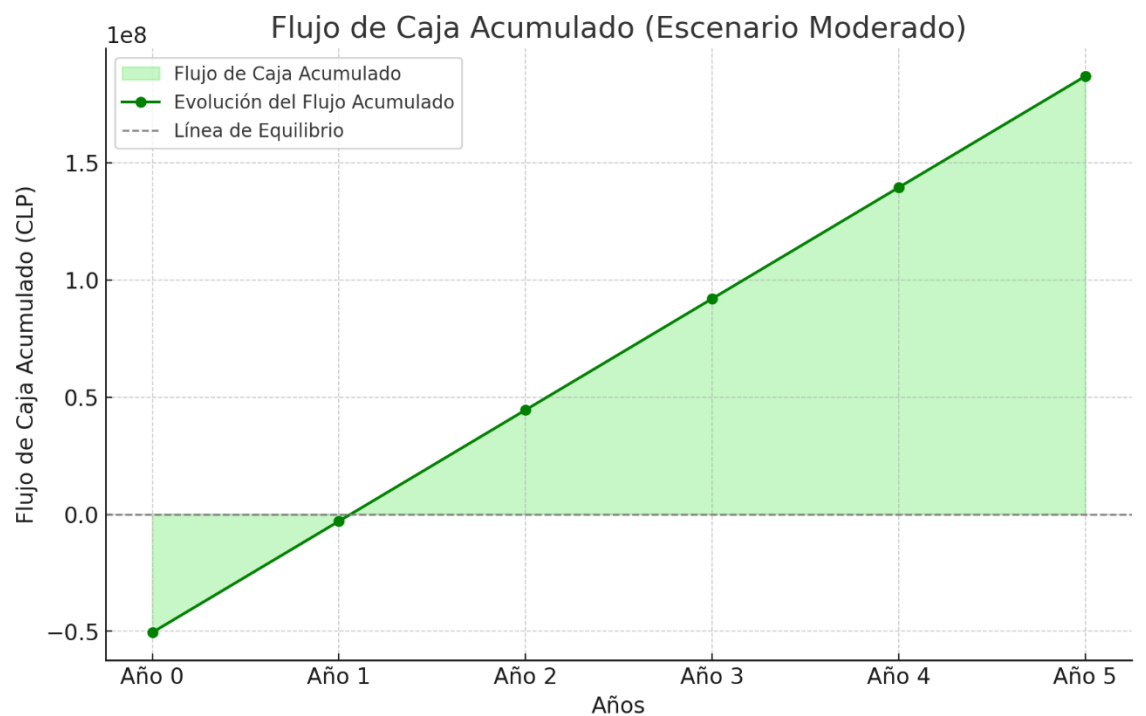


Fig. 4-3. Flujo de caja acumulado en un escenario moderado.

Año 0: Se observa una inversión inicial negativa de -50.501.572 CLP, representada como un punto en la parte inferior del gráfico.

A partir del primer año, se registra un flujo positivo de 47.497.369,22 CLP que contribuye al incremento del flujo acumulado.

Años 2 a 5: El flujo de caja acumulado sigue creciendo de manera constante, alcanzando 237.486.846 CLP en el quinto año

Línea de equilibrio: La inversión inicial se recupera antes del tercer año, lo que se representa visualmente cuando la curva cruza la línea horizontal en cero.

4.8.2.9. Conclusión escenario moderado

El proyecto, bajo este escenario moderado, es altamente viable desde un punto de vista técnico y financiero, con un VAN elevado, TIR superior al 90% y un rápido retorno de inversión. Este análisis destaca la importancia de mantener un volumen mínimo de

operaciones y un control eficiente de los costos fijos para maximizar los beneficios. Además, la estabilidad proyectada del flujo de caja hace que el proyecto sea atractivo incluso bajo escenarios de incertidumbre moderada, lo que refuerza su sustentabilidad a largo plazo.

4.8.3. Escenario optimista con 15 análisis por semana

Costos variables				
Reactivos	Valor unitario (\$)	Volumen (Litros o Kg)	Cantidad (Botellas)	Valor total (\$)
Hidróxido de sodio (NaOH) p.a.	12970	0,5	1	12970
Solución de BF ₃ al 14% en Metanol	64500	0,5	4	258000
Patrón interno: C23:0 metil éster	288462	0,001	3	865386
Isooctano (grado cromatografía)	129000	2,5	5	645000
Cloruro de Sodio (NaCl) p. a	14000	25	1	14000
Hidrogeno	225000		2	450000
Aire	60000		9	540000
nitrógeno	68000		2	136000
Metanol p.a.	39000	2,5	2	78000
				2999356

Tabla 4-14. Costos variables escenario optimista.

Depreciación lineal (Equipos)	8738031,2
amortización Lineal (Software)	1169423,2
Periodo de la inversión	5 años
Tasa de descuento	0,12 (12%)
Tasa de impuesto	0,27 (27%)

Ingresos por escenarios	\$200000 Por cada muestra	
análisis por semana		15

	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 4
Ingresos		156000000	156000000	156000000	156000000	156000000
Costos Variables		2999356	2999356	2999356	2999356	2999356
Costos Fijos		50501572	50501572	50501572	50501572	50501572
Depreciación Lineal		8738031,2	8738031,2	8738031,2	8738031,2	8738031,2
Amortización Lineal		1169423,2	1169423,2	1169423,2	1169423,2	1169423,2
Utilidad Bruta		102499072	102499072	102499072	102499072	102499072
Impuesto 27%		27674749,44	27674749,44	27674749,44	27674749,44	27674749,44
Utilidad Neta		74824322,56	74824322,56	74824322,56	74824322,56	74824322,56
Inversión	-50501572					
Flujo Total	-50501572	84731777	84731776,96	84731776,96	84731776,96	84731776,96
EBIDTA		102499072	102499072	102499072	102499072	102499072
VAN	254937521,2					
TIR	1,6653					
PRI						
AÑO 1	84731776,96					
AÑO 2	169463553,9					
AÑO 3	254195330,9					
AÑO 4	338927107,8					
AÑO 5	423658884,8					

Tabla 4-15. Flujo de caja escenario optimista.

4.8.3.1. Alta rentabilidad del proyecto:

Con un Valor Actual Neto (VAN) de 254.937.521,2 CLP, el proyecto no solo recupera la inversión inicial, sino que también genera un valor agregado significativo.

La Tasa Interna de Retorno (TIR) del 166,53% es extraordinariamente alta, muy superior al costo de capital esperado, lo que implica que el proyecto es muy rentable incluso frente a fluctuaciones en las tasas de interés o cambios en los costos operativos.

4.8.3.2. Rápida recuperación de la inversión (PRI):

La inversión inicial de 50.501.572 CLP se recupera antes del segundo año de operación, lo que indica un bajo riesgo financiero.

Este rápido retorno de capital hace que el proyecto sea atractivo para potenciales inversores, ya que reduce la exposición prolongada al riesgo.

4.8.3.3. Ingresos y costos:

Ingresos anuales: 156.000.000 CLP, impulsados por un volumen de 15 análisis semanales a 200.000 CLP por análisis.

Costos variables: 2.999.356 CLP anuales, lo que indica un buen control de los gastos directos por análisis.

Costos fijos: 50.501.572 CLP anuales, que representan un porcentaje considerable, pero la economía de escala permite diluir este costo al incrementar el volumen de análisis.

4.8.3.4. Margen de utilidad:

El proyecto logra una utilidad bruta de 102.499.072 CLP y una utilidad neta de 74.824.322,56 CLP tras impuestos, lo que equivale a un margen de utilidad neta superior al 48%.

Este elevado margen indica una operación eficiente y con gran capacidad para generar beneficios sostenibles

4.8.3.5. Crecimiento del flujo de caja acumulada:

A partir del primer año, el flujo de caja anual es 84.731.776 CLP y sigue aumentando de manera sostenida.

Al final del quinto año, el flujo de caja acumulado alcanza 423.658.884 CLP, mostrando un crecimiento continuo y estable que fortalece la posición financiera del proyecto.

4.8.3.6. Robustez frente a incertidumbres:

Este escenario muestra que, incluso con pequeñas variaciones en los costos o ingresos, el proyecto mantendría su rentabilidad debido al amplio margen de beneficios

La operación a 15 análisis semanales convierte a los costos fijos en un porcentaje menor de los ingresos, optimizando la eficiencia económica.

4.8.3.7. Gráfico escenario optimista

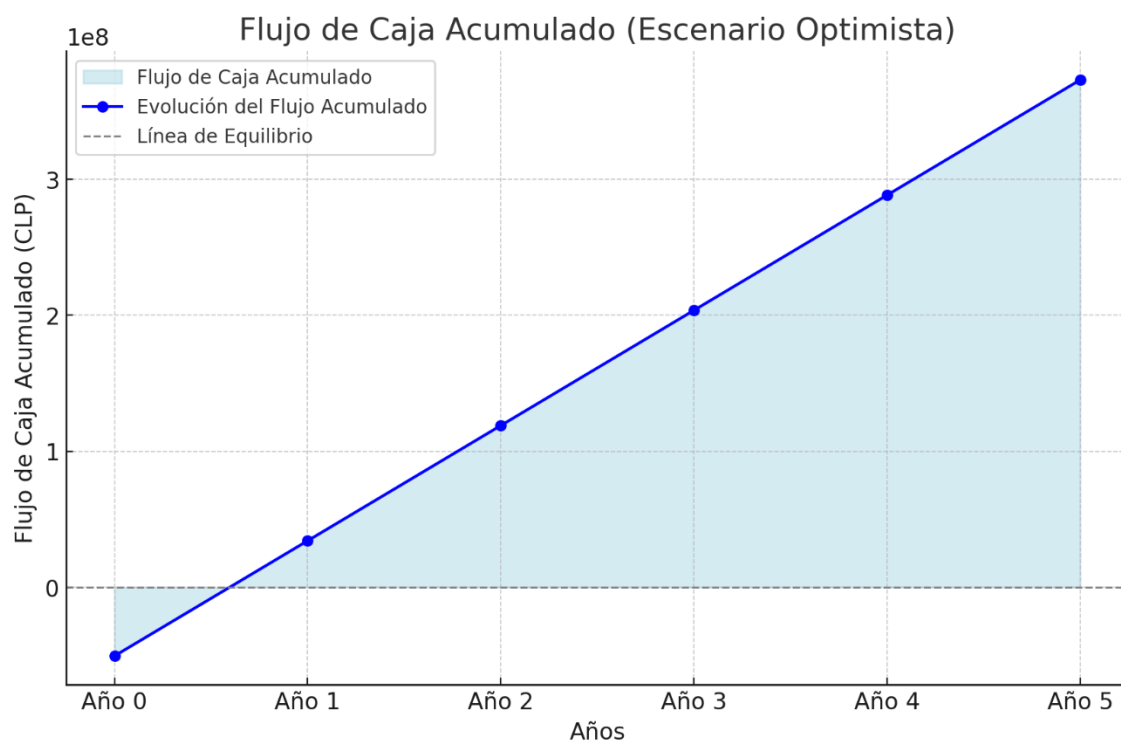


Fig. 4-4. Flujo de caja acumulado en un escenario optimista

Interpretación:

Este gráfico demuestra que, en el escenario optimista, se recupera la inversión inicial en solo 1 año.

A partir de ese momento, el proyecto empieza a generar ganancias netas.

Al Año 5, el flujo de caja acumulado es de aproximadamente CLP 373 millones.

4.8.3.8. Conclusión escenario optimista

El escenario optimista confirma la viabilidad técnica y económica del proyecto al operar con 15 análisis semanales. La alta rentabilidad, la rápida recuperación de la inversión y el margen de utilidad elevado indican que el proyecto tiene un sólido potencial para generar beneficios sostenibles a largo plazo. Además, su estructura financiera proporciona un margen de seguridad frente a variaciones del mercado, consolidando al proyecto como una inversión segura y rentable bajo estas condiciones operativas.

4.8.4. Comparación grafica de los tres escenarios

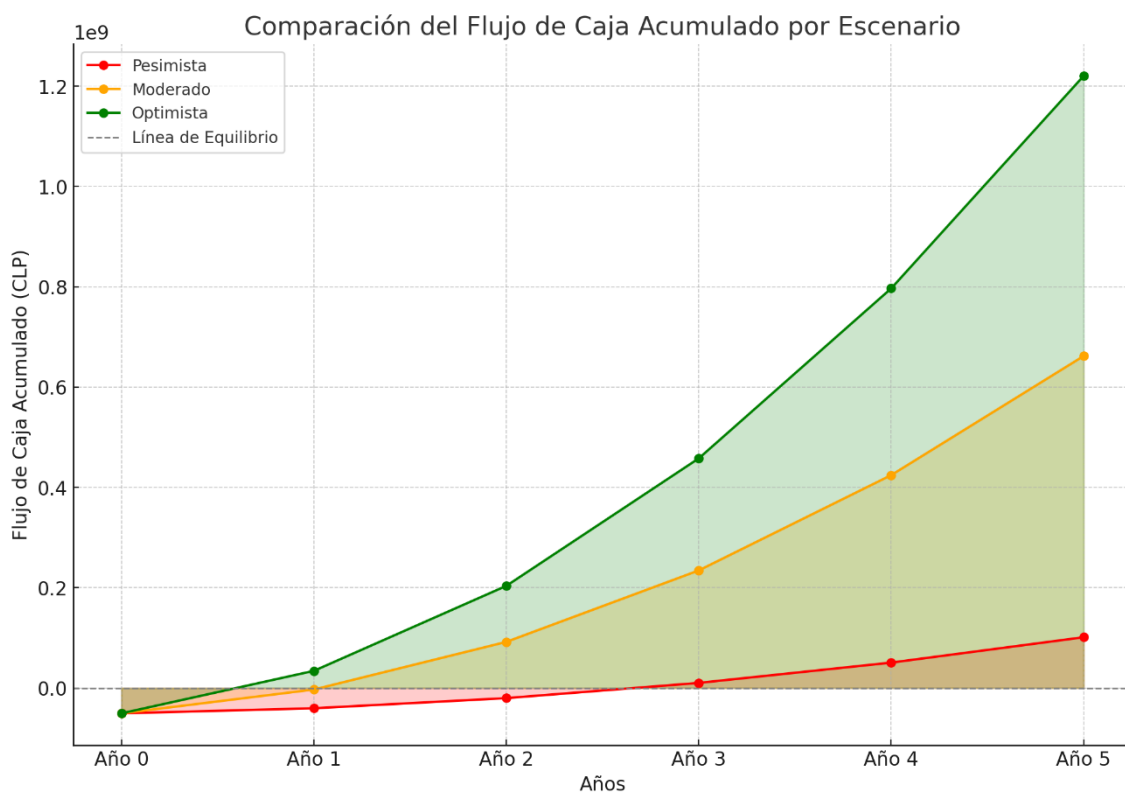


Fig. 4-5. Comparación de los flujos de cajas de cada escenario.

Este gráfico muestra la evolución del flujo de caja acumulado para tres escenarios: pesimista (rojo), moderado (naranja) y optimista (verde)

4.8.4.1. Línea roja (Escenario Pesimista):

- En este escenario, los ingresos son los más bajos.
- La inversión inicial se recupera recién en el Año 3.
- Después de ese punto, comienza la rentabilidad, aunque es más lenta en comparación con los otros escenarios.

4.8.4.2. Línea naranja (Escenario Moderado):

- Representa un escenario conservador, donde los ingresos son intermedios.
- La inversión inicial se recupera en el Año 2.
- A partir de ahí, los flujos se acumulan con un ritmo más alto que el escenario pesimista.

4.8.4.3. Línea verde (Escenario Optimista):

- En este escenario, los ingresos proyectados son altos.
- La inversión inicial se recupera rápidamente, en el Año 1.
- La curva muestra un incremento acelerado debido a ingresos constantes y altos.

4.8.4.4. Línea de equilibrio (línea gris punteada):

- La línea horizontal en 0 marca el punto en el que se recupera la inversión.

- Cada línea cruza este punto en un momento diferente:
- Pesimista: Año 3
- Moderado: Año 2
- Optimista: Año 1

4.8.4.5. Conclusiones del gráfico:

Riesgo vs. Rentabilidad:

- El escenario pesimista tarda más en recuperar la inversión y podría ser más riesgoso.
- El escenario optimista es más rentable, pero podría ser menos realista si los ingresos proyectados son difíciles de alcanzar.

Rentabilidad acumulada:

Al Año 5, el escenario optimista tiene el flujo de caja más alto, seguido del moderado y, finalmente, el pesimista.

4.9. CONCLUSIÓN DEL CAPITULO 4 ESTUDIO DE COSTOS

El análisis económico realizado para la implementación del método de cuantificación de ácidos grasos EPA y DHA mediante cromatografía de gases ha permitido evaluar la viabilidad financiera del proyecto. Los costos asociados con la inversión inicial en equipos, como el cromatógrafo TRACE 1600 y los reactivos necesarios para los análisis, han sido considerados junto con los costos operativos anuales, incluidos los costos de mantenimiento, insumos de laboratorio y recursos humanos.

Los escenarios proyectados (pesimista, moderado y optimista) ofrecen un panorama claro sobre la rentabilidad del proyecto bajo diferentes condiciones de operación. En el escenario pesimista, los ingresos por análisis de muestras son insuficientes para cubrir la inversión inicial, lo que resulta en un VAN negativo y una TIR baja. Sin embargo, en los escenarios moderado y optimista, se observa una mejora significativa en los ingresos debido al aumento en la cantidad de muestras analizadas, lo que genera flujos de caja más altos y mejora los indicadores económicos.

Con base en estos resultados, el análisis de flujo de caja muestra que, bajo condiciones moderadas y optimistas, el proyecto es económicamente viable y tiene el potencial de recuperar la inversión en un plazo relativamente corto, asegurando la sostenibilidad financiera del laboratorio en el largo plazo.

Por lo tanto, este estudio de costos y análisis del flujo de caja ratifica que la implementación del nuevo método analítico no solo es técnicamente viable, sino también económicamente rentable, contribuyendo a la diversificación de los servicios del laboratorio y fortaleciendo su posición estratégica dentro de la industria pesquera.

REFERENCIAS

- Bruice, Paula Yurkanis. Química Orgánica. 8.^a ed., Pearson Education, 2017.
- Valenzuela Sanhueza, A., y De la Barra, J. Título de la obra. Editorial, 2012.
- Coronado Vega, R., León Gutiérrez García, M., y Díaz, J. Título de la obra. Editorial, 2006.
- Christie, W. W., 1993. Cromatografía de gases y lípidos: una guía práctica. Bridgwater: La prensa aceitosa.
- Calder, P. C., 2015. Ácidos grasos omega-3 marinos y procesos inflamatorios: efectos, mecanismos y relevancia clínica. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biología molecular y celular de los lípidos*, 1851(4), pp. 469-484.
- García Peña, C. M., Fernández Cervera, M., y Sanz Pedraja, Y., 2016. Validación y aplicación de un método de cromatografía gaseosa para determinar ácidos grasos en diferentes matrices de aceite de hígado de tiburón. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(3), pp. 48-59.
- AOAC Internacional, 1991. Método oficial de la AOAC 991.39: Ácidos grasos en aceites de pescado encapsulados. Rockville, Maryland.
- Felizardo, P., y Correia, M. J. N., 2007. *Production of biodiesel via acid catalysis*. *Chemical Engineering Journal*, 134(1-3), pp. 119-126.
- McNair, H. M., & Miller, J. M., 2011. Cromatografía básica de gases. 2^a ed. Wiley-Interscience.
- ISO, 2015. ISO 12966-4: Grasas y aceites animales y vegetales — Cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos — Parte 4: Determinación por cromatografía de gases capilar. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- Zhang, J., y Xu, Y., 2015. Estudio comparativo de gases portadores en GC: hidrógeno versus helio y nitrógeno. *Revista de cromatografía*, 139(5), pp. 102-110.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R., 2017. Principios del Análisis Instrumental. 7^a ed. Cengage Learning
- Lambert, J., 2018. Principios de cromatografía. Springer, Nueva York
- Holčapek, M., Jandera, P., Zderadicka, P., & Hrubá, L., 2005. Caracterización de especies moleculares de triacilglicerol y diacilglicerol en aceites vegetales mediante cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica. *Revista de cromatografía A*, 1054(1-2), pp. 43-57.
- Lumley, I., 2001. Una evaluación crítica de los procedimientos cromatográficos y de cálculo utilizados para determinar cuantitativamente los ácidos grasos. LGC, Queens Road, Teddington, Reino Unido.
- ICH. Q2(R1): Validación de Procedimientos Analíticos: Texto y Metodología. Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano, 2005.
- AOAC Internacional. Métodos oficiales de análisis. 20^a ed., Gaithersburg, MD: AOAC International, 2016.
- ISO 11843-1. Capacidad de detección. Parte 1: Términos y definiciones. Ginebra: Organización Internacional de Normalización, 1997.
- USP. <1225> Validación de procedimientos analíticos. Farmacopea de los Estados Unidos, 2022.

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE NORMALIZACIÓN (ISO). ISO 5725-2:1994. Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y resultados – Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad de un método de medición estándar. Ginebra: ISO, 2019.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Principios de análisis instrumental. 6ª ed. México: Cengage Learning, 2014. ISBN 978-6075260286.

SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA (SERNAPESCA). Guía de validación de métodos analíticos para laboratorios de control de productos pesqueros. Valparaíso: SERNAPESCA, 2018.

NORTON, S. y PARKIN, M. Evaluación de Proyectos y TIR: Aplicaciones en Ingeniería Química. Londres: Pearson, 2018. ISBN 978-0321673174.

CROMTEK SPA. Especificaciones técnicas del equipo TRACE 1600 para cromatografía de gases. Santiago: Cromtek, 2024.

MCCAIN, R. A.; MILLER, J. Separación cromatográfica y análisis de muestras orgánicas. Cambridge: Academic Press, 2011. ISBN 978-0123864894.