



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA

CON EL TEMA:

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN PROSPECTIVA DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FERULATOS DE FITOESTEROLES COMO COMPONENTES MAYORITARIOS DEL γ -ORYZANOL PRESENTE EN LÍPIDOS DE SALVADO DE ARROZ”.

MEDIANTE:

OPCIÓN VII

MEMORIA DE EXPERIENCIA PROFESIONAL

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

OCTUBRE 2013



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	2
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO I. GENERALIDADES DEL PROYECTO	9
1.1. Justificación.....	10
1.2. Objetivos.....	12
1.2.1. Objetivo general.....	12
1.2.2. Objetivos específicos.....	12
1.3. Caracterización del área de trabajo.....	13
1.3.1. Misión.....	14
1.3.2. Visión.....	14
1.3.3. Política de calidad.....	14
1.4. Planteamiento del problema.....	15
1.5. Alcances	15
1.6. Limitaciones.....	16
CAPÍTULO II. FUNDAMENTO TEÓRICO	17
2.1. Validación de métodos analíticos.....	18
2.1.1. ¿Qué validar?.....	18
2.1.2. ¿Qué es la validación de un método?.....	18
2.1.3. Objetivos de la validación.....	19
2.1.4. Tipos de validación.....	19
2.1.4.1. Validación prospectiva.....	19
2.1.4.2. Validación Retrospectiva.....	19
2.1.4.3. Revalidación o post-validación.....	19
2.1.5. ¿Por qué es necesaria la validación de un método?.....	19
2.1.6. ¿Cuándo deben validarse los métodos?.....	20
2.1.7. ¿Cómo deben validarse los métodos?.....	20
2.1.8. Parámetros de validación de métodos analíticos.....	22
2.1.8.1. Exactitud.....	22
2.1.8.2. Precisión.....	23
2.1.8.3. Sensibilidad.....	24
2.1.8.4. Límite de detección.....	24
2.1.8.5. Límite de cuantificación.....	24
2.1.8.6. Linealidad y rango.....	24



2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	25
2.2.1. Concepto general.....	25
2.2.2. Características del equipo HPLC.....	26
2.2.2.1. Fase móvil y desgasificador.....	27
2.2.2.2. Sistema de bombeo.....	29
2.2.2.3. Sistema de inyección de muestra.....	29
2.2.2.4. Columnas cromatográficas.....	30
2.2.2.5. Detectores.....	31
2.2.2.6. Sistema de toma y procesamiento de datos.....	32
2.2.3. Parámetros cromatográficos.....	32
2.2.3.1. Tiempo de retención.....	32
2.2.3.2. Tiempo muerto.....	33
2.2.3.3. Factor de retención.....	33
2.2.3.4. Selectividad.....	34
2.2.3.5. Eficiencia.....	35
2.2.3.6. Resolución.....	40
2.2.4. Aplicaciones de la cromatografía.....	41
2.2.4.1. Análisis cualitativo.....	41
2.2.4.2. Análisis cuantitativo.....	42
2.2.5. Calibración del equipo de HPLC.....	43
2.2.5.1. Aptitud del sistema.....	44
2.3. El salvado de arroz.....	45
2.3.1. Definición.....	45
2.3.2. Productos obtenidos a partir del salvado de arroz.....	45
2.3.3. Aceite de salvado de arroz.....	46
2.3.3.1. Componentes principales del aceite de salvado de arroz.....	47
2.3.3.2. Componentes menores del aceite de salvado de arroz.....	48
2.3.3.2.1. Tocolos.....	49
2.3.3.2.2. Fitoesteroles.....	50
2.3.3.2.3. Policosanoles.....	51
2.3.3.2.4. Gamma oryzanol.....	52
2.3.3.3. Propiedades del aceite de salvado de arroz.....	53
2.3.3.4. Beneficios para la salud del aceite de salvado de arroz y sus constituyentes.....	55
2.3.4. Panorama mundial de la producción de aceite de salvado de arroz.....	61
CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES.....	63
3.1. Descripción del método analítico.....	64



3.1.1. Condiciones ambientales.....	64
3.1.2. Preparación de solventes.....	64
3.1.3. Preparación del estándar.....	65
3.1.4. Preparación de la muestra.....	65
3.1.5. Procedimiento o desarrollo del método de análisis.....	65
3.2. Establecimiento de las condiciones y alcance de la validación.....	66
3.2.1. Establecimiento de las condiciones de la validación.....	66
3.2.2. Establecimiento del alcance de la validación	66
3.2.3. Clasificación de la validación según el tipo de procedimiento de ensayo... 67	
3.2.3.1.- Método de ensayo normalizado.....	67
3.2.3.2. Método de ensayo no normalizado.....	67
3.2.3.3. Métodos desarrollados.....	67
3.2.4. Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba.....	67
3.2.5. Seleccionar el tipo de matriz a evaluar.....	69
3.2.6. Determinar los parámetros de desempeño a evaluar.....	69
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	75
4.1. Resultados.....	76
4.2. Discusión de resultados.....	101
CONCLUSIÓN.....	104
ANEXOS.....	105
A. Glosario.....	105
B. Preparación de la curva de calibración.....	108
C. Cromatogramas.....	109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos.....	26
Figura 02. Esquema de un HPLC.....	27
Figura 03. Cromatograma característico de una mezcla de dos componentes...	33
Figura 04. Definición de la altura de plato.....	37
Figura 05. Determinación de la desviación estándar τ de un pico cromatográfico: $W = 4\tau$	38
Figura 06. Representación esquemática de las mediciones de eficiencia (Número de platos teóricos en la columna).....	39
Figura 07. Separaciones correspondientes a tres resoluciones distintas.....	40
Figura 08. Derivado obtenido a partir del salvado de arroz con valor agregado...	46



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Principales clases de lípidos de aceite crudo de salvado de arroz extraído del salvado de arroz crudo y su composición de ácidos grasos.....	48
Tabla 02. Composición de ácidos grasos como un porcentaje de lípido total de aceite de salvado de arroz en comparación con la de maíz, de cacahuete, de soja y aceites de semillas de algodón.....	48
Tabla 03. Contenido de tocoles (T) y tocotrienoles (T3) de aceite de salvado de arroz en comparación con otros aceites vegetales comunes en orden de abundancia descendente.....	50
Tabla 04. Comparación del contenido de tocoles y tocotrienoles (ppm equivalente a mg/Kg) en aceite de salvado de arroz y otros aceites vegetales.....	54
Tabla 05. Características fisicoquímicas del aceite de salvado de arroz refinado.....	54



INTRODUCCIÓN

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual obtenemos información. Se realizan millones de análisis cada día en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, análisis medioambientales, análisis químicos y físicos, en todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en el área de aseguramiento de la calidad, permiten conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de un estudio y programa documentado que ese método posee todos los requisitos para el uso propuesto. La validación es parte integral de las Buenas prácticas de manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis, puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un producto alimenticio cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegurar las propiedades de calidad de un producto determinado. La calidad de los resultados analíticos debe ser acaparada mediante la fiabilidad y reproducibilidad del método analítico utilizado en su obtención, y esta demostración debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos. Este tema ha sido objeto de diversos estudios desde hace años y es recomendado por diferentes organismos de carácter oficial; desde la Federal Drug Administration (FDA) en 1976 con su primer concepto en la revisión de las normas correctas de fabricación al considerar los procesos de esterilización. Siete años después, esta misma entidad establece directrices del tipo informativo, que orientan hacia la validación de procesos en un sentido más amplio. Conscientes de la importancia del tema, otras entidades como la OMS, la AOAC, AOCS, además la Farmacopea Europea y la USP 23 consignan la ineludible necesidad de la validación en los procesos analíticos.

Dentro de los métodos de análisis que existen para la determinación y cuantificación del Gamma-Oryzanol se encuentra la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, se pueden analizar sus componentes mayoritarios del Gamma-Oryzanol en un solo análisis por este sistema cromatográfico. Una de las opciones de determinación y cuantificación de estos ferulatos de fitoesteroles es por el método diseñado en el laboratorio de control de calidad mediante muestras de aceite vegetal de salvado de arroz y estándar puro de Gamma Oryzanol.



El salvado de arroz contiene entre 17 y 22% de aceite que puede ser extraído y que convenientemente refinado constituye un valioso producto para la alimentación humana. Para la extracción industrial de aceite se utiliza una mezcla de salvados de arroz blanco (70%) y vaporizado (30%). En la fracción lipídica del salvado de arroz se encuentran triglicéridos formados mayoritariamente por los ácidos grasos palmítico (12.3-20.5%), linoleico (27.0-40.7%) y oleico (37.1-52.8%) (Tortosa y Barber, 1979). Entre los antioxidantes presentes, son de destacar los tocoferoles y tocotrienoles (tocolos), que presentan una importante actividad vitamínica, y los ésteres del ácido trans-ferúlico con esteroides y alcoholes triterpénicos, cuya fracción se conoce como Gamma-Oryzanol (Rodríguez, Onoyama y Meirelles, 2006; Kim *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2003; Fang y Badger, 2003; Juliano *et al.*, 2005).

Entre los tocoferoles presentes en el salvado de arroz y en el aceite extraído del mismo, predominan alfa, beta y gama tocoferol. Estos compuestos tienen actividad antioxidante y desempeña un papel protector frente algunas formas de cáncer (Block y Langseth, 1994; Gliszczynska.Swiglo y Sikorska, 2004; Kamal-Edin y Appelqvist, 1996; kim *et al.*, 2001). El Gamma-Oryzanol presenta una alta actividad antioxidante, y diversos estudios han demostrado su capacidad para reducir el colesterol plasmático, reducir la absorción del colesterol hepático y prevenir la arteriosclerosis (Wilson *et al.*, 2007; Gong-Yuansheng y Yao-Huiyuan, 2001; Nyström *et al.*, 2007; Nyström *et al.*, 2005). Por tanto debido a este valor funcional del aceite vegetal de salvado de arroz se adapta a las actuales exigencias en el sector alimenticio donde no solo se busca satisfacer la necesidad de comer sino también de proveer una protección de la salud del consumidor.



CAPÍTULO I

GENERALIDADES DEL PROYECTO



1.1. JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de control de calidad que utiliza un método analítico es el responsable de asegurar que el método haya sido validado. En ciertos casos el laboratorio debe llevar a cabo trabajo adicional para complementar los datos existentes sobre la validación. Por ejemplo, cuando un método ha sido validado por organizaciones que publican normas, tales como AOAC (Association of Analytical Chemist) entre otras, el usuario solo necesita establecer datos de desempeño para el uso del método.

Mucho se ha publicado en literaturas acerca de la validación de métodos analíticos mediante comparaciones interlaboratorios. Hay numerosos documentos que relacionan este tipo de validación. Si se desarrolla un método de ensayo con amplias perspectivas de uso, quizás como un procedimiento normalizado publicado, entonces, una comparación que involucre un grupo de laboratorios es probablemente la manera preferida de llevar a cabo la validación. Sin embargo no siempre es una opción conveniente para los laboratorios de ensayos industriales. La aplicación para que el método se requiera puede ser secreta, en tal magnitud que ningún otro laboratorio estaría interesado en colaborar. Aquellos que podrían estar interesados serían los competidores.

El costo de realizar mediciones analíticas es elevado y surgen costos adicionales de las decisiones tomadas en base a los resultados. Por ejemplo, las pruebas que muestran que algún alimento no es adecuado para su consumo pueden resultar en demandas por compensación; pruebas que confirmen la presencia de drogas prohibidas podrían ocasionar multas, encarcelamiento o más aun, la ejecución en algunos países (Food and Drug Administration. 1987). Claramente es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que lo es.

Si el resultado de una prueba no es confiable entonces tiene poco valor y la prueba no debió haberse realizado así, si un “cliente” encarga un trabajo analítico a un laboratorio, se supone que el laboratorio tiene un nivel de conocimiento experto que el cliente no tiene por sí mismo. El cliente espera poder confiar en el resultado reportado y por lo general solo los cuestiona cuando surge una controversia. De este modo, el laboratorio y su personal tienen una clara responsabilidad de corresponder a la confianza del cliente proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema en otras palabras, proporcionando resultado que han demostrado ser “adecuados a su propósito”.



Con el poco conocimiento que se tiene de que el método propuesto no está totalmente desarrollado ni validado por alguna empresa en México. Es por ello el interés en la empresa Sesajal S.A. de C.V. de establecer el proyecto “DESARROLLO Y VALIDACIÓN PROSPECTIVA DE UN MÉTODO ANALITICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FERULATOS DE FITOESTEROLES COMO COMPONENTES MAYORITARIOS DEL gamma-ORYZANOL PRESENTE EN LÍPIDOS DE SALVADO DE ARROZ”. Para el desarrollo de un método confiable de determinación.



1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Proponer una metodología analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, que cumpla con los requerimientos mínimos para llevar a cabo actividades de validación prospectiva del método desarrollado por el laboratorio, para la determinación y cuantificación de ferulatos de fitoesteroles como componentes mayoritarios del gamma-*ORYZANOL* en lípidos de salvado de arroz para la empresa Sesajal S.A de C.V.

1.2.2. Objetivos específicos

- Proponer un método de análisis selectivo para la determinación y cuantificación de ferulatos de fitoesteroles del gamma-*ORYZANOL* en lípidos de salvados de arroz utilizando cromatografía líquida de alta resolución con objeto de demostrar su utilidad práctica en el laboratorio de control de calidad.
- Que la metodología propuesta cumpla con los parámetros o criterios preestablecidos en procedimientos de validación de métodos analíticos, para confirmar que esta puede aplicarse correctamente antes de utilizarla para los ensayos analíticos.
- Desarrollo de un protocolo con los criterios mínimos para llevar a cabo las actividades de validación prospectiva.
- Evaluar mediante la validación prospectiva si el sistema cromatográfico es apto para llevarse a cabo el análisis en el laboratorio de control de calidad.

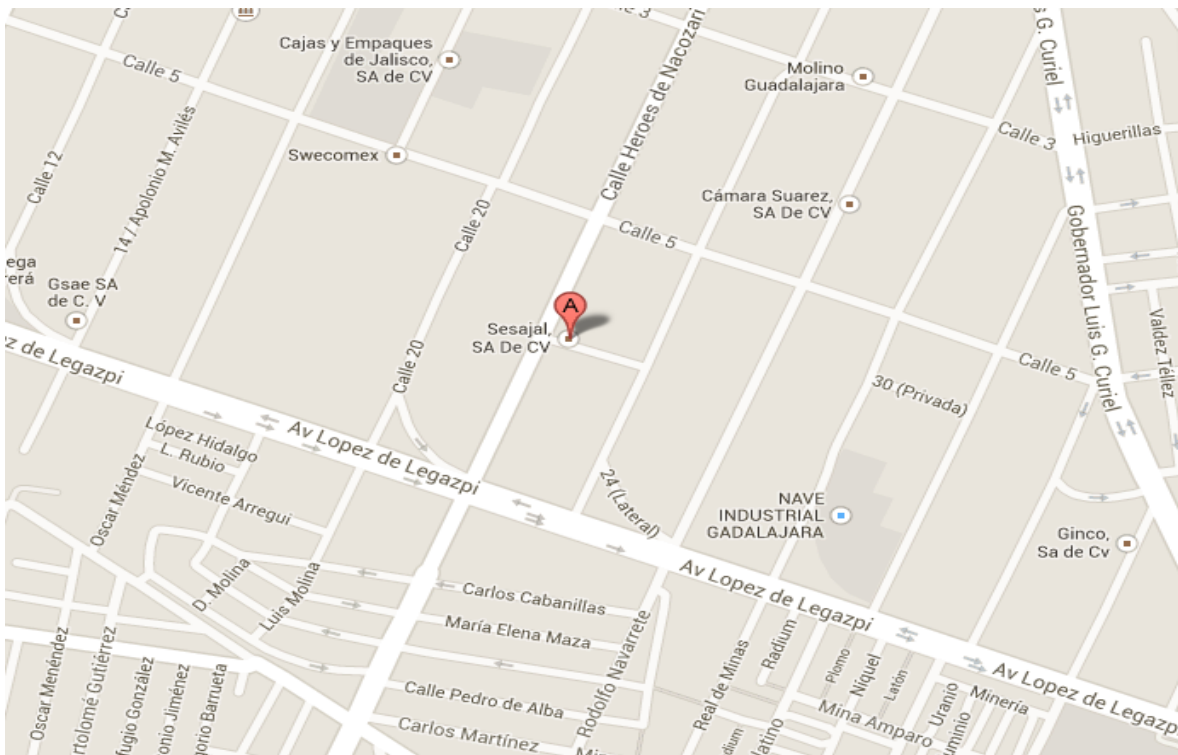


1.3. Caracterización del área de trabajo

Sesajal S.A de C.V. es una empresa 100% mexicana con más de 20 años de experiencia en la producción y distribución de gran variedad de productos orgánicos y convencionales ofreciendo soluciones integrales para la industria alimenticia, farmacéutica y del cuidado personal, iniciaron operaciones en 1989 y desde entonces son líderes en la fabricación de aceites vegetales especializados, semillas oleaginosas y sus derivados tanto convencionales como orgánicos. Nuestra política de desarrollo nos ha permitido diversificar nuestra línea de productos y actualmente se cuenta con garbanzo, tahini (pasta de ajonjolí), fruta deshidratada en polvo y endulzantes.

Gracias a la filosofía de calidad y servicio se ha trascendido fronteras distribuyendo en tiempo y forma eficientemente nuestros productos a cada uno de nuestros clientes en los cinco continentes desde nuestra planta ubicada en la ciudad de Guadalajara, Jalisco; zona estratégica tanto para las operaciones de logística y embarque entre México y el resto del mundo como para el abasto de materias primas.

Ubicación.



Calle 22 #2332, Zona Industrial, 44940 Guadalajara, Jalisco



1.3.1. Misión

Ser un proveedor estratégico a nivel mundial que procesa y comercializa productos especializados para la industria alimenticia, farmacéutica y del cuidado personal.

1.3.2. Visión

- Líderes en el mercado de aceites especializados tanto envasados como a granel y en semilla de ajonjolí y sus derivados.
- Operadores con los más altos estándares de calidad e inocuidad en procesos y productos.
- Enfocados en perseguir un constante crecimiento en el mercado internacional y domestico que se sustente en mejores productos y servicios.
- Promotores de productos orgánicos y funcionales.
- Cuidadosos de mantener la solidez financiera en nuestras operaciones.
- Preocupados por el bienestar y desarrollo individual, familiar y social de nuestro personal, al cual consideramos el capital más importante de la empresa.
- Comprometidos con el desarrollo del campo mexicano, la sustentabilidad del medio ambiente y la responsabilidad social.
- Innovadores de productos para la industria alimenticia, farmacéutica, cuidado personal, suplemento alimenticio y alimentación animal.

1.3.3. Política de calidad

Sesajal S.A de C.V. busca obtener la satisfacción de sus clientes ofreciendo productos inocuos y de calidad, que cumplen con los requisitos legales, se elaboran considerando la mejora, la seguridad y gestión ambiental de sus procesos.



1.4. Planteamiento del problema

El constante crecimiento y expansión del mercado exige que las empresas se preparen y busquen calidad en sus productos y procesos, para utilizarlo como una ventaja competitiva. Lo anterior, aumenta la necesidad de obtener certificaciones que garanticen la calidad del producto, como por ejemplo la certificación ISO y dentro de sus requisitos se encuentra que los productos deben ser evaluados con metodologías de análisis validadas.

Los métodos de análisis utilizados para el control de calidad de productos alimenticios que no se traten de métodos oficiales de análisis (registrados o contemplados en organismos oficiales), deben validarse previamente a su uso de rutina y tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para llevar a cabo un análisis determinado.

Con la elaboración de este proyecto se espera lograr resolver los problemas siguientes:

- La falta de la información técnica para llevar a cabo el proceso de validación hacia el método planteado y traslaparlo hacia otros métodos en uso.
- Obtener las herramientas necesarias para cumplir con las actividades de validación.
- Contar una técnica analítica validada para la determinación y cuantificación de componentes principales del gamma-oryzanol.
- Dar más controles de calidad para el desarrollo de nuevos métodos analíticos.
- Aun no existe un método analítico en México aprobado por organizaciones oficiales, y es por eso que se está planteando esta técnica.

1.5. Alcance

- La propuesta aplica hasta la determinación y cuantificación de ferulatos de fitoesteroles como componentes del gamma-Oryzanol en los productos que requiera el Sistema de Gestión Integral de la empresa Sesajal S.A. de C.V.



1.6. Limitaciones

- No se cuenta con el tiempo necesario para llevar una validación completa para tener en cuenta más parámetros de validación.
- No se cuenta con otro analista en el área para satisfacer otros parámetros de validación.
- No se cuenta con un inyector automático para mejorar el parámetro de repetibilidad y reproducibilidad.



CAPÍTULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO



2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Validación de métodos analíticos

2.1.1. ¿Qué validar?

En un laboratorio de análisis debe considerarse para validar todo equipo o procedimiento que influya en la calidad final del resultado, así tenemos:

- Los equipos, incluido en control por computadora.
- Los métodos de análisis (se considera aquella que no están comprendidos en obras oficiales como: AOAC, USP, etc.)
- El sistema analítico en su conjunto.
- Todo cambio o modificaciones importantes que se efectúen en el método, equipo o técnicas de análisis del producto.

2.1.2. ¿Qué es la validación de un método?

La definición ISO de validación se da en el Anexo A. Esta se puede interpretar para la validación de método como el proceso de definir una necesidad analítica y conformar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación. Esta implícita la necesidad de evaluar las capacidades de desempeño del método.

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizaran usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente y que están calibrados adecuadamente. Asimismo el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio.

Generalmente se considera que la validación del método está ligada estrechamente con el desarrollo del método. De hecho, no es posible determinar exactamente donde termina el desarrollo del método y donde empieza la validación. Por lo general, muchos de los parámetros de desempeños del método que están asociados a su validación son evaluados.



2.1.3. Objetivo de la validación

El objetivo de la validación de un método analítico es dejar evidencia, mediante documentación, del cumplimiento de las condiciones de exactitud, precisión y confiabilidad, así como de la integridad y recuperabilidad de los resultados de los ensayos efectuados. De este modo queda demostrado que se puede confiar en un método para producir el resultado esperado dentro de los límites definidos.

2.1.4. Tipos de validación

2.1.4.1. Validación prospectiva

Se realiza cuando se trata del diseño o de la adecuación de un método de análisis para un producto o proceso determinado.

2.1.4.2. Validación retrospectiva

Se realiza cuando un método analítico que se ha venido utilizando durante mucho tiempo, no dispone de la evidencia experimental y documentada sobre su validez.

2.1.4.3. Revalidación o post-validación

Se realiza cuando un método validado ha sido modificado en alguno de los pasos del procedimiento establecido, o se ha variado alguno de los instrumentos, reactivos, o materiales empleados originalmente.

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

Millones de mediciones analíticas se realizan diariamente en miles de laboratorios alrededor del mundo. Hay innumerables razones para realizar esas mediciones, por ejemplo: como una forma de evaluar bienes para propósito de comercio, etc.

El costo de realizar estas mediciones es elevado y surgen costos adicionales de las decisiones tomadas en base a los resultados. Por ejemplo, las pruebas que muestran que algún alimento no es adecuado para su consumo pueden resultar en demandas por compensación. Claramente es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que lo es.

Si el resultado de una prueba no es confiable entonces tiene poco valor y la prueba no debió haberse realizado así. Si un “cliente” encarga un trabajo analítico a un laboratorio, se supone que el laboratorio tiene un nivel de conocimiento experto que el cliente no tiene por sí mismo. El cliente espera poder confiar en los resultados reportados y por lo general solo los cuestiona cuando surge una



controversia. De este modo, el laboratorio y su personal tienen una clara responsabilidad de corresponder a la confianza del cliente proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema. La validación del método permite a los químicos demostrar que el método es “adecuado para su propósito”.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en este pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado.

A pesar de lo bueno que es un método y de lo bien que se ha usado, un problema analítico puede resolverse mediante el análisis de muestras solo si estas son apropiadas al problema. En estas ocasiones los resultados de análisis tendrán que ser reportados en base a como se recibieron las muestras y el informe debe indicar esta distinción claramente.

2.1.6. ¿Cuándo deben validarse los métodos?

1.- Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico. Por ejemplo:

- Un nuevo método desarrollado para un problema específico.
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

2.- El alcance de la validación o la revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar un método a diferentes laboratorios, instrumentación, operadores y circunstancias en las cuales el método va ser utilizado. Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados.

2.1.7. ¿Cómo deben validarse los métodos?

1.- El laboratorio que utiliza un método es responsable de asegurar que el método este validado adecuadamente y si, es necesario, de llevar a cabo trabajo adicional para complementar los datos ya existentes. Como ejemplo, cuando un método ha



sido validado por una organización de aprobación de normas, como la AOAC internacional, por lo general, el usuario necesitara únicamente establecer los datos de desempeño del método para propio uso.

2.- Un laboratorio que emplea un método analítico que no está referenciado a un método autorizado validado totalmente, deberá demostrar que su método ha sido totalmente documentado y probado contra el patrón actualmente recomendado por el método de referencia autorizado. Deberá demostrar que se han establecido:

- Las tolerancias requeridas para todas las mediciones realizadas dentro del método (volumen, temperatura, masas, etc.).
- Las formas del analito medido, incluyendo la especiación.
- El efecto de las interferencias ha sido ampliamente identificado y cuantificado.
- Se han identificado las fuentes significativas de error y los medios adecuados para controlarlas.

3.- La AOAC internacional (Association of Official Analytical Chemists) siempre ha sido partidaria de las pruebas interlaboratorios como la forma adecuada para la validación de métodos.

4.- El laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse con el fin de validar el método. La caracterización del desempeño del método es un proceso costoso pero puede restringirse inevitablemente por consideraciones de tiempo y costo. El laboratorio deberá hacer lo mejor que pueda con las restricciones impuestas, tomando en cuenta las necesidad del cliente, la experiencia existente sobre el método y la necesidad de compatibilidad con otros métodos similares que ya estén en uso dentro del laboratorio o en otros laboratorios. Algunos de los parámetros pudieran haber sido determinados aproximadamente durante la etapa de desarrollo del método.

5.- Los requisitos de validación pueden ser especificados en guías dentro de un sector particular de mediciones concernientes al método y es recomendable que, si se tiene disponible, sean seguidas. Por ejemplo, la validación de un método para análisis de alimentos debe ser consistente con la estrategia de validación usada por la AOAC. Los requisitos de normalización pueden requerir que un método en particular sea seguido al pie de la letra aun cuando el laboratorio lo considere inexacto o inapropiado. Una validación adicional será necesaria para confirmar el desempeño satisfactorio del analista.

6.- Frente a un problema analítico particular, idealmente, el laboratorio debería primeramente acordar con el cliente una necesidad analítica la cual define los



requisitos de desempeño que un método debe de tener para ser adecuado para resolver el problema analítico.

2.1.8. Parámetros de validación de métodos analíticos

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en la validación son los siguientes.

- Exactitud.
- Precisión.
- Límite de Detección.
- Límite de Cuantificación.
- Especificidad.*
- Selectividad.*
- Sensibilidad.
- Linealidad.
- Rango.

*Algunas autoridades hacen la distinción entre especificidad y selectividad. Ambos términos se refieren a la habilidad del método de proveer un cálculo de analito en presencia de otros componentes de una muestra. La diferencia está en que la selectividad del método provee exactitud de resultados para todos los analitos de interés, mientras que la especificidad está referida a la exactitud de resultados de un analito y otros de interés pueden interferir uno con otros. A continuación definiremos los diferentes parámetros de validación junto con una breve explicación de cómo puede medirse.

2.1.8.1. Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados, obtenidos por ese método y el valor real. La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analitos. Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos.

Como se trata de un parámetro cualitativo (un método será muy o poco exacto) para describir el error asociado a un resultado, hace falta un parámetro que permita medir la exactitud cuantitativa. Este parámetro es el error que se divide en dos componentes, la veracidad y la precisión. La veracidad es un parámetro que expresa la proximidad de la media de una serie de resultados obtenidos con el método al valor real y normalmente se expresa en término de sesgo. La precisión



da cuenta de la proximidad entre sí de esta serie de resultados y por lo general se expresa mediante medidas como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados.

Como se ha dicho anteriormente la veracidad da cuenta de lo cercano del resultado medio obtenido con el método y el valor real. Para asegurar la veracidad es necesario comparar el valor medio medido con un valor de referencia certificado o comparando con un método ya validado (que suele haber sido sometido a un ejercicio de intercomparación). En caso de no existir materiales de referencia o no tener posibilidad de aplicar el método de referencia, se puede simular la matriz de la muestra añadiendo al analito en una cantidad conocida y efectuar un ensayo de recuperación añadiendo al analito sobre la propia muestra.

Como se dará a conocer en los siguientes capítulos, para comparar dos valores será necesario conocer la precisión con la que este ha sido obtenido, por ello la exactitud se evalúa a partir de la veracidad en conjunto con la precisión.

2.1.8.2. Precisión

Normalmente la precisión se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la repetibilidad y la reproducibilidad. Estas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un periodo corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado. Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (esta es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo). Puede ser que algunos casos particulares sea más útil una medida intermedia de la precisión, por ejemplo la precisión medida entre diferentes analistas, en periodos de tiempo prolongados, dentro de un solo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia”, pero las condiciones exactas deberán ser especificadas. La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad como la repetibilidad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito. La desviación estándar relativa puede ser más útil en este caso puesto que la desviación estándar dividida por la concentración es prácticamente



constante dentro del intervalo de interés, a condición de que este no sea demasiado grande.

2.1.8.3. Sensibilidad

Se define como la capacidad de un método analítico para detectar pequeñas variaciones en las concentraciones de analito en la muestra. Se calcula inyectando concentraciones menores a las del rango de trabajo y en esas concentraciones se determina la ecuación de la recta. Cuando trabajamos con curvas de calibración, la sensibilidad es la pendiente de la curva a una concentración dada. En caso de ser una recta, coincide con la pendiente de la misma.

Según la IUPAC la sensibilidad se define como el cociente entre la señal medida y la concentración de analito.

2.1.8.4. Límite de detección

El límite de detección es un parámetro de pruebas de límite. Es la concentración más baja de analito que pueda detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límites solamente fundamentan que la concentración del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad. Este parámetro hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza, es decir que se puede diferenciar la respuesta dado por un blanco. El cual contiene todos los componentes de la muestra menos el compuesto de estudio.

2.1.8.5. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es un parámetro de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo impurezas en materias primas y productos de degradación en productos terminados. Se define como la mínima concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones establecidas.

2.1.8.6. Linealidad y rango

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales o mediante una transformación matemática bien definida se convierten directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. La linealidad generalmente se expresa en función de la varianza alrededor de la pendiente de la recta de regresión calculada, según



una relación matemática establecida, a partir de los resultados obtenidos mediante el análisis de muestra con diferentes concentraciones de analito.

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior del analito, incluyendo estos valores, que se ha demostrado son determinados con precisión, exactitud y linealidad, empleando el método tal cual está escrito. La linealidad de un método analítico se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos a partir del análisis de muestras con concentraciones de analito a lo largo del rango propuesto por el método. El tratamiento normalmente es el cálculo de una recta de regresión, por el método de cuadrados mínimos, de los resultados de la prueba frente a las concentraciones de analito. En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre el resultado de la valoración y la concentración de la muestra, puede ser necesario someter los datos de la prueba a una transformación matemática antes del análisis de regresión. La pendiente de la línea de regresión y su varianza es una medida matemática de la linealidad; la ordenada al origen es una medida de la desviación potencial de la valoración. El rango del método se valida comprobando que el método analítico proporciona una precisión, exactitud y linealidad aceptables.

2.2. Cromatografía líquida de alta resolución

2.2.1. Concepto general

La Cromatografía Líquida de Alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada para la separación, identificación cualitativa y determinación cuantitativa de componentes químicos en mezclas complejas. Esta técnica de separación constituida por una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.

Las separaciones se logran por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Los compuestos a analizar se disuelven en un líquido orgánico y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por su factor de capacidad, ya que depende de la naturaleza química del compuesto analizado, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil y la composición y el área superficial de la fase estacionaria. La longitud de la columna es un parámetro determinante de la resolución. Solo los compuestos que tienen diferentes factores de capacidad pueden ser separados por HPLC. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés para la industria en muchos campos de la ciencia y para la sociedad.

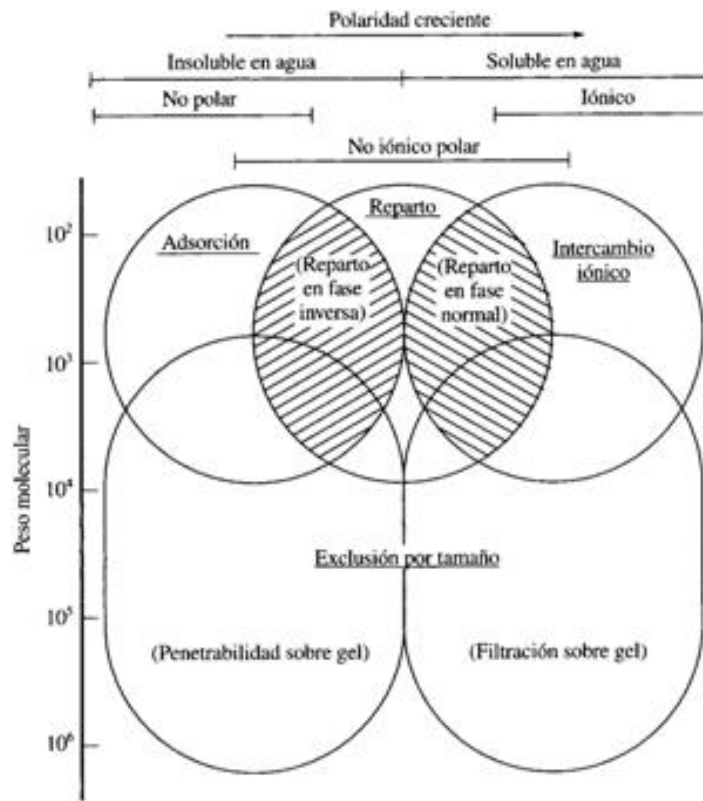


Figura 01. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos

2.2.2. Características del equipo HPLC

Un cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables, normalmente constituyendo módulos con funciones bien definidas. La circulación de fase móvil entre los distintos módulos se hace a través de conductos tubulares. Deben emplearse siempre diámetros de tubo muy pequeños a fin de reducir el efecto del ensanchamiento de banda extracolumnar.

Los elementos indispensables en cualquier cromatógrafo de HPLC son: sistema de suministro de inyección (con depósito de disolventes y bomba de alta presión), sistemas de inyección, columna cromatográfica, detector y un sistema para el tratamiento de datos. Existen además otros elementos adicionales que pueden mejorar algunos aspectos de la separación o la detección.

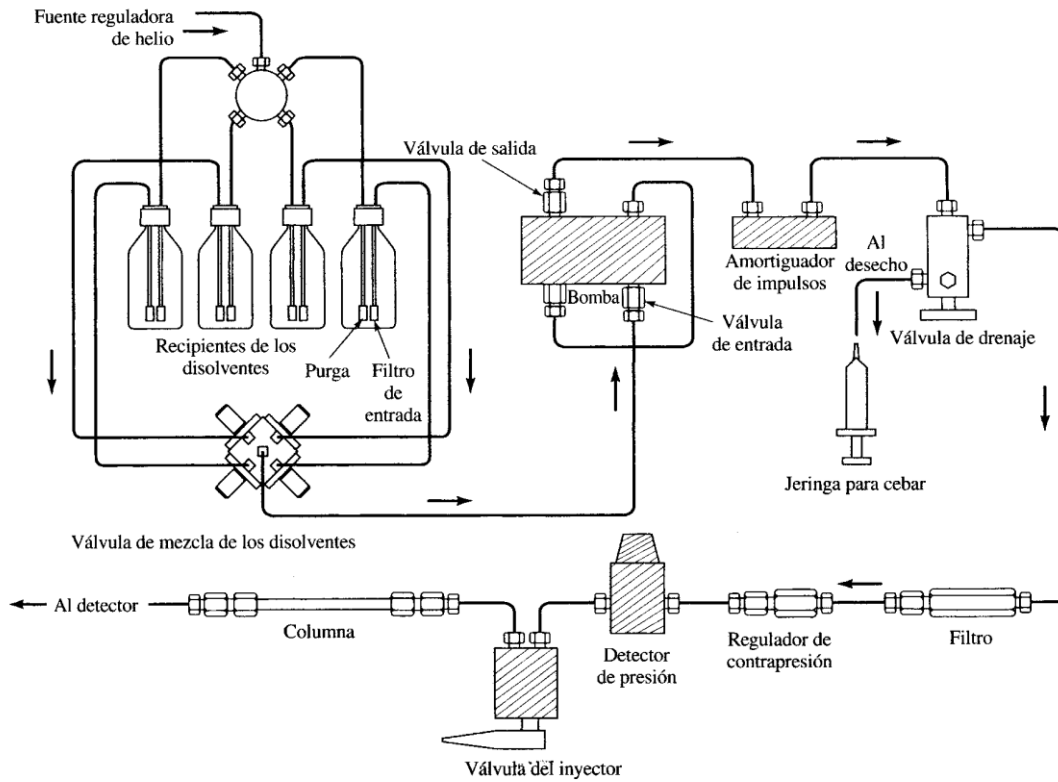


Figura 02. Esquema de un HPLC.

2.2.2.1. Fase móvil y desgasificador

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes junto con la muestra que está siendo separada o analizada que se mueve en el interior de la columna. Algo importante es que deben ser grado HPLC los disolventes, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna y desgasificados.

Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con aceros inoxidable. Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol.



Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén realizados. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que puedan contener la fase móvil.

Un requisito técnico importante es que los disolventes empleados deben carecer de gases disueltos, ya que estos pueden provocar serios problemas por formación de burbujas. Es frecuente por ello la desgasificación de los disolventes.

A menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos en general oxígeno y nitrógeno que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamiento de bandas y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que estas partículas dañen la bomba o los sistemas de inyección u obstruyan la columna. No es necesario que los desgasificadores y los filtros sean partes integrantes de los sistemas de HPLC, una forma conveniente de tratar los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, consiste en filtrarlos a vacío a través de un filtro (millipore) de tamaño de poro muy pequeño. Este tratamiento elimina los gases, así como la materia en suspensión.

Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía líquida son las siguientes:

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatibles con el tipo de detector utilizado.
- tener una polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna, si el disolvente de la muestra y de la fase móvil es muy



diferente en polaridad, causando pérdida de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben de seleccionar con cuidado.

2.2.2.2. Sistema de bombeo

Todos los equipos de HPLC incluyen un sistema de bombeo de fase móvil de alta presión para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna, cuyo relleno muy compacto, es responsable de una importante sobrepresión. Los requisitos del sistema de bombeo en HPLC son muy rigurosos ya que en algunos detectores las fluctuaciones en el flujo de fase móvil dan lugar a fluctuaciones de la señal, produciendo un ruido de fondo que impide la observación de señales débiles. En HPLC es deseable que el control y la reproducibilidad del caudal de fase móvil sean mejores que el 0.5%. Existen diferentes tipos de bombas de alta presión con distintas características, ventajas e inconvenientes. Las más frecuentes son bombas de pistón.

Las bombas recíprocas o de vaivén, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno.

Las bombas de desplazamiento o tipo jeringa, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250ml. Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos: el método más simple es la utilización de una jeringa de alta presión con un diafragma a la entrada de la columna. Esta limitado a una presión máxima de operación. Las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado.

Las bombas neumáticas o de presión constante, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas.

2.2.2.3. Sistema de inyección de muestra

El método de introducción de la muestra es de importancia capital, pues un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamiento de la banda cromatográfica que deterioren la eficacia del sistema cromatográfico.



Un inyector ideal debe tener las siguientes características: ser de fácil manejo, dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica, ser capaz de trabajar a presiones elevadas.

Fundamentalmente existen dos tipos de inyectores manuales: los de jeringa y los de válvula.

Los inyectores de jeringa, este tipo de inyectores la introducción de la muestra en la columna se realiza por medio de una jeringa cuya aguja entra en el sistema cromatográfico a través de una membrana, lo que permite depositar la muestra en la cabeza de la columna. Las ventajas de este tipo de inyector, radican en su facilidad de construcción y en que permiten sacar todo el partido a la eficacia ofrecida por la columna; por el contrario, son inyectores que presentan una gran falta de reproducibilidad, tienen una presión de trabajo limitada y son de gran dificultad de manejo.

Los inyectores de válvula, este tipo de inyección consiste en una válvula de seis vías, dos de las cuales están conectadas entre sí por medio de una espira (loop). Esta espira es un tubo de volumen conocido, cuya misión es la de contener la muestra antes de efectuarse la inyección. La introducción de la muestra se lleva a cabo en dos etapas; la primera se realiza a presión atmosférica, y consiste en cargar la muestra en la espira con ayuda de una jeringa; en la segunda, mediante un giro de la válvula, se hace pasar el eluyente a través de la espira hacia la columna.

La inyección mediante válvulas es con mucho la más utilizada, ya que reúne prácticamente todas las características exigibles a un inyector.

2.2.2.4. Columnas cromatográficas

La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad nunca se obtendrán buenos resultados aunque se disponga del mejor instrumental.

Las columnas más utilizadas en cromatografía de líquidos son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo de separación que se pretende llevar a cabo. El diámetro interno varía entre 2 y 60 mm dependiendo su utilización, a escala analítica o semipreparativa, y su longitud varía entre 5 y 30 cm.



También se encuentran hoy en día en el mercado columnas de pequeño diámetro, con diámetros comprendidos entre 2 y 0.5 mm y longitudes entre 25 y 100 cm. Este tipo de columnas permiten reducir el consumo de disolventes y, por lo tanto, facilitan la posibilidad de acoplar la cromatografía líquida a otras técnicas analíticas (fundamentalmente espectrometría de masas).

Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son: diámetro interno, longitud, conexiones, relleno y tamaño de partícula del relleno.

No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los HPLC modernos están equipados con calentadores o que regulan la temperatura de la columna.

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la pre-columna, que retiene por absorción las impurezas de forma irreversible. En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, la composición del relleno de la pre-columna debería ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partículas es por lo común mayor para minimizar la caída de presión. Cuando la pre-columna se contamina, se vacía y se rellena de nuevo o se reemplaza por otra nuevas del mismo tipo. Así, la pre-columna se sacrifica para proteger a la columna analítica.

2.2.2.5. Detector

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes provenientes de la separación en la columna, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra, se coloca al final de las columnas y responde a la concentración del soluto.

El detector debe reunir una serie de características como son: tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad, amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura.

Los detectores pueden ser clasificados dentro de dos categorías; los detectores basados en una propiedad de disolución que responden cualquier cambio de alguna propiedad física de la fase móvil, tal el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden



únicamente a propiedades del analito, como la absorbancia UV, fluorescencia, o actividad electroquímica, que no son propias de la fase móvil.

La mayoría de los fabricantes de instrumentos de HPLC ofrecen detectores de absorción ultravioleta, es el detector más empleado en HPLC, posee buena sensibilidad y rango lineal, el cual le permite detectar analitos en el orden de los nanogramos, no es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes con la única limitación de que estos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo de 190 a 350 nm y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/Vis.

2.2.2.6. Sistema de toma y procesamiento de datos

Para toma de datos, procesamiento de datos y el reporte, el uso de un sistema informático integrado es esencial. El sistema integrado, recibe y almacena la señal de los detectores e imprime cromatograma completos, e incluso controla la mayoría de variables operativas como selección de muestras, válvulas de muestreo, condiciones de detector, entre otros; simplificando el trabajo tedioso de una selección manual de las condiciones operativas cromatográficas: con el objetivo de obtener el cromatograma con fracciones separadas e idénticas de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas de mezclas complejas (Cazer J., 2005).

2.2.3. Parámetros cromatográficos

2.2.3.1. Tiempo de retención (t_R)

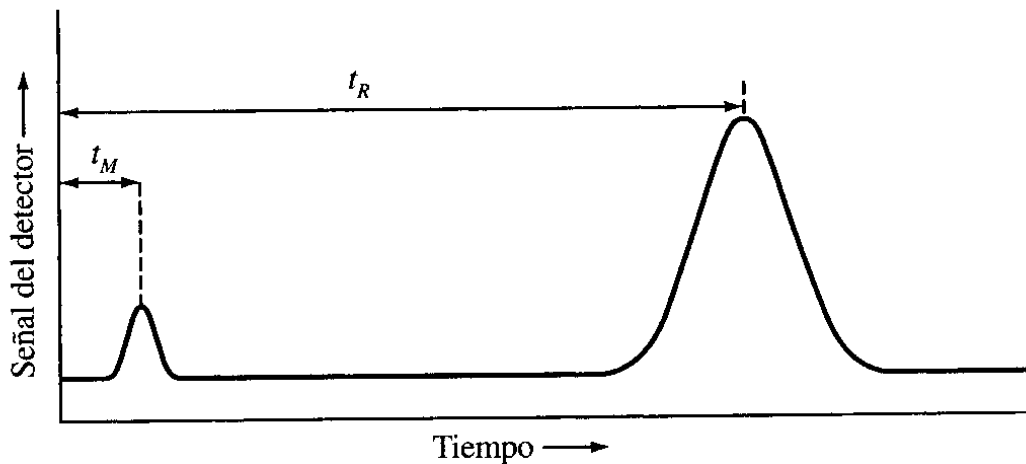


Figura 03. Cromatograma característico de una mezcla de dos componentes.

La Figura 07 muestra un cromatograma característico para una muestra que contiene un solo analito. Cada componente específico está representado por un pico en el cromatograma, estos picos son simétricos y se asemejan a una curva de distribución normal tipo Gaussiana (Skoog *et. al.*, 2001).

El tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector se le denomina tiempo de retención y se le da el símbolo (t_R). El pico pequeño de la izquierda corresponde a una especie que no es retenida por la columna. A menudo la muestra o la fase móvil contiene una especie que no se retiene. Cuando no es así, este tipo de especies pueden añadirse para facilitar la identificación de los picos. El tiempo de retención de analito es dependiente del caudal de fase móvil; a mayor velocidad del caudal de flujo, más pequeño es el tiempo de retención del analito.

2.2.3.2. Tiempo muerto

Es el tiempo requerido por un compuesto inerte para migrar desde la inyección en la columna sin retraso por la fase estacionaria hasta el detector. A este parámetro se le da el símbolo (t_M).

2.2.3.3. Factor de retención

El factor de retención o factor de capacidad es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en las columnas.



La retención del analito se compone de dos partes: 1) el tiempo que el analito eluye en la fase móvil; 2) el tiempo que el analito es retenido en la fase estacionaria. La diferencia entre el tiempo total de retención (t_R), y el tiempo de demora, se denomina tiempo de retención reducido (t'_R), y la correspondiente diferencia entre el volumen de retención del analito y el volumen muerto se llama volumen de retención reducido (V'_R).

La relación entre el volumen de retención reducido y del volumen muerto da un parámetro adimensional llamado factor de retención, (K) llamado también factor de capacidad.

$$K = \frac{V'_R - V_0}{V_0} = \frac{V'_R}{V_0} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Cuando el factor de retención para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención. Cuando el factor de retención es del orden de 20 o 30 o tal vez mayor, los tiempos de retención de elución son excesivamente largos. Idealmente, las separaciones en unas condiciones en la que los factores de retención para las especies de una mezcla oscilan entre 2 y 10.

2.2.3.4. Selectividad

La capacidad del sistema cromatográfico para discriminar diferentes analitos se llama selectividad (α). La selectividad se determina como la relación de los factores de retención de dos analitos. La retención relativa es independiente de la longitud de columna y la velocidad de flujo, por el contrario es dependiente de la temperatura y las propiedades de la fase móvil y la fase estacionaria.

El factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (2)$$

Donde K_B es el coeficiente de distribución para la especie más fuertemente retenida B, y K_A es el coeficiente de distribución para la menos retenida, o que eluye con más rapidez, la especie A. según esta definición α siempre es mayor que la unidad.



2.2.3.5. Eficacia

Dos términos afines se utilizan ampliamente como medidas cuantitativas de la eficacia de una columna cromatográfica: (1) la altura de plato H y (2) el número de platos teóricos N . Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N=L/H \quad (3)$$

Donde L es la longitud (normalmente en centímetros) del relleno de la columna. La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos teóricos, y cuanto menor es la altura de plato. Se ha encontrado enormes diferencias en las eficacias debido a diferencias en el tipo de fases móvil y estacionaria utilizadas. Las eficacias en términos de números de platos puede variar desde pocos cientos a varios cientos de miles; no son infrecuentes las alturas de plato que oscilan de unas pocas décimas a una milésimas de centímetros o metros.

El origen de los términos altura de plato y número de platos teóricos proviene de un estudio teórico pionero de Martin y Synge en el que trataron una columna cromatográfica como si fuera similar a una columna de destilación que estuviera constituida por numerosas capas estrechas, discretas pero contiguas, denominadas platos teóricos. Se suponía que en cada plato se establecía el equilibrio de la especie entre las fases móvil y estacionaria. El movimiento del analito a través de la columna se trataba entonces como una transferencia por etapas de la fase móvil equilibrada de un plato al siguiente.

La teoría del plato explica con éxito la forma gaussiana de los picos cromatográficos y su velocidad de desplazamiento a través de la columna. Sin embargo, al final se abandonó a favor de la teoría de la velocidad, debido a que la primera fallaba al intentar justificar el ensanchamiento de pico de una manera mecanicista. No obstante, los términos originales para la eficacia se han incorporado a la teoría de las velocidades. Esta nomenclatura es tal vez algo desafortunada pues tiende a perpetuar el mito de que una columna contiene platos donde se dan las condiciones de equilibrio. De hecho, el estado de equilibrio nunca se puede alcanzar con la fase móvil moviéndose constantemente.



La anchura de una curva gaussiana está directamente relacionada con la varianza σ^2 o la desviación estándar σ de una medida. En general se asume que las bandas cromatográficas tienen una forma gaussiana, por ello resulta conveniente definir la eficacia de una columna en los términos de varianza por unidad de longitud de la columna. De esta forma, la altura de plato H viene dada por:

$$H = \sigma^2 / L \quad (4)$$

Esta definición de la altura de plato se ilustra en la Figura 08, donde se muestra una columna con un relleno de L cm de longitud. Encima de este esquema se muestra una gráfica que representa la distribución de las moléculas a lo largo de la columna en el momento en que el pico del analito alcanza el extremo final del relleno (es decir, en el tiempo de retención t_R). La curva es gaussiana, y la ubicación de $L - 1\sigma$ y $L + 1\sigma$ se indica mediante líneas verticales discontinuas. Obsérvese que las unidades de L son centímetros y las σ^2 son centímetros cuadrados; de este modo H representa una distancia lineal, en centímetros. De hecho, puede pensarse en la altura de plato como la longitud de columna (en el extremo de la columna) que contiene la fracción de analito comprendida entre $L - 1\sigma$ y L . Debido a que el área bajo la curva normal de error limitada por $\pm \sigma$ es aproximadamente el 68 % del área total, una altura de plato, tal como se ha definido, contiene un 34% del analito.

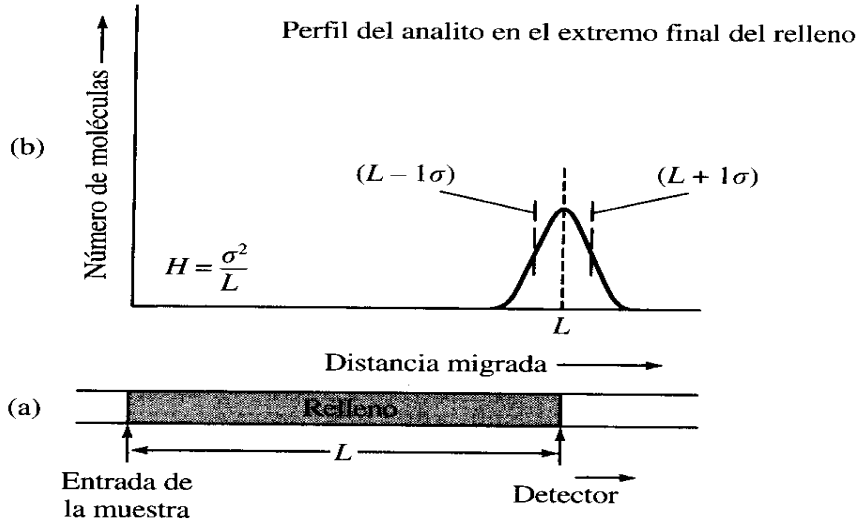


Figura 04. Definición de la altura de plato

En la Figura 09 muestra un cromatograma característico con el tiempo en abscisas. La varianza del pico del analito, que se puede obtener por un procedimiento grafico sencillo, tiene unidades de segundos al cuadrado y normalmente se designa como τ^2 para distinguirlo de σ^2 , que tiene unidades de centímetros al cuadrado. Las dos desviaciones estándar τ y σ se relacionan por:

$$\tau = \sigma / (L/t_R) \quad (5)$$

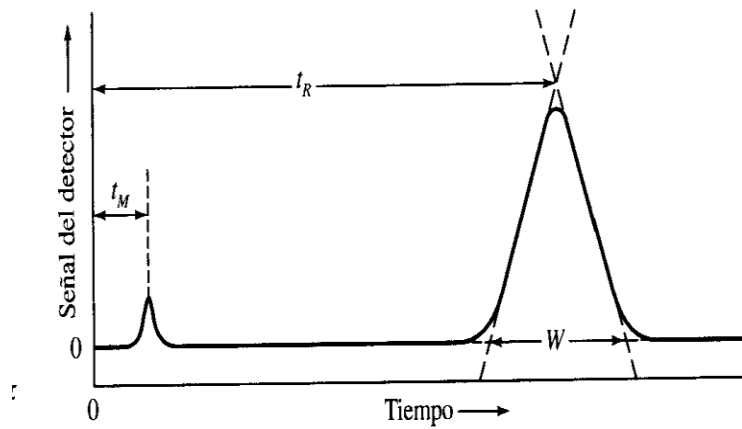


Figura 05. Determinación de la desviación estándar τ de un pico cromatográfico:
 $W = 4\tau$

Donde L/t_R es la velocidad lineal promedio de la especie en centímetros por segundo. La Figura 09 ilustra una manera sencilla de deducir aproximadamente τ y σ a partir de un cromatograma experimental. Se trazan las tangentes en los puntos de inflexión a los dos lados del pico cromatográfico, y se extienden para formar un triángulo con la línea base del cromatograma. Puede demostrarse que el área de este triángulo es aproximadamente el 96% del área total bajo el pico, el cual se encuentra dentro del intervalo comprendido entre más y menos dos desviaciones estándar ($\pm 2\sigma$) alrededor de su máximo. Así, las intersecciones indicadas en la Figura 09 tienen lugar a una distancia del máximo de aproximadamente $\pm 2\sigma$, y $W = 4\tau$, donde W corresponde a la base del triángulo. Al sustituir esta relación en la Ecuación 5 y reordenando se obtiene:

$$\sigma = (LW)/4t_R \quad (6)$$

La sustitución de esta ecuación para σ en la Ecuación 4 da:

$$H = (LW^2)/(16t_R^2) \quad (7)$$

Para obtener N , sustituir en la Ecuación 3 y reordenar para dar:

$$N = 16(t_R/W)^2 \quad (8)$$

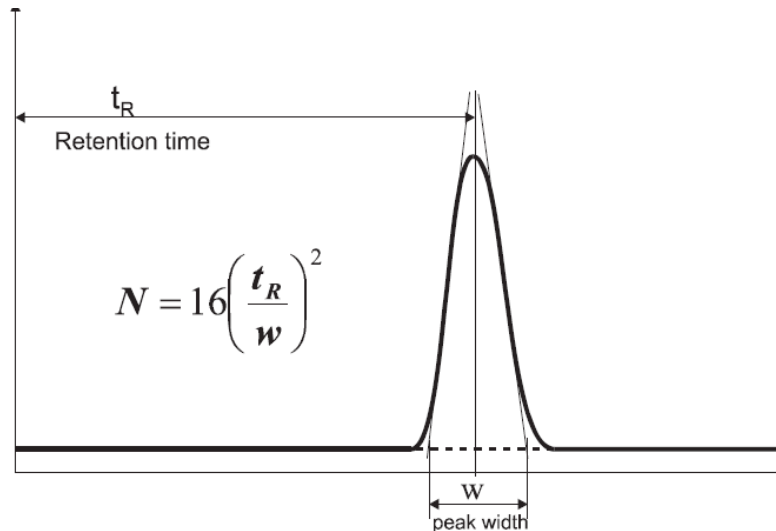


Figura 06. Representación esquemática de las mediciones de eficiencia. (Número de platos teóricos en la columna).

De este modo, N se puede calcular a partir de dos medidas del tiempo, t_R y W ; para calcular H , se ha de conocer también la longitud del relleno de la columna L .

Otro método para evaluar N , que algunos autores creen más fiable, se basa en determinar $W_{1/2}$, la anchura del pico a la mitad de su altura máxima. El número de platos viene entonces dado por:

$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2 \quad (9)$$

El número de platos teóricos N y la altura de plato H se utilizan con frecuencia, tanto en la bibliografía como los fabricantes de instrumentos, para evaluar la eficacia de la columna. Para que esos números tengan sentido en la comparación de dos columnas, es esencial que se hayan determinado utilizando el mismo compuesto.

El número de los platos teóricos caracteriza la calidad de la columna y los fenómenos de transferencia de masas. Valores grandes para N califican la columna para separar mezclas complejas.

2.2.3.6. Resolución

La resolución R_s de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. En la Figura 11 se ilustra la significación de este término; en ella se muestra los Cromatogramas de las especies A y B correspondientes a tres columnas con resoluciones diferentes. La resolución de una columna se define como:

$$R_s = \Delta Z / (W_A/2 + W_B/2) = 2 \Delta Z / (W_A + W_B) = 2 \{(t_R)_B - (t_R)_A\} / (W_A + W_B) \quad (10)$$

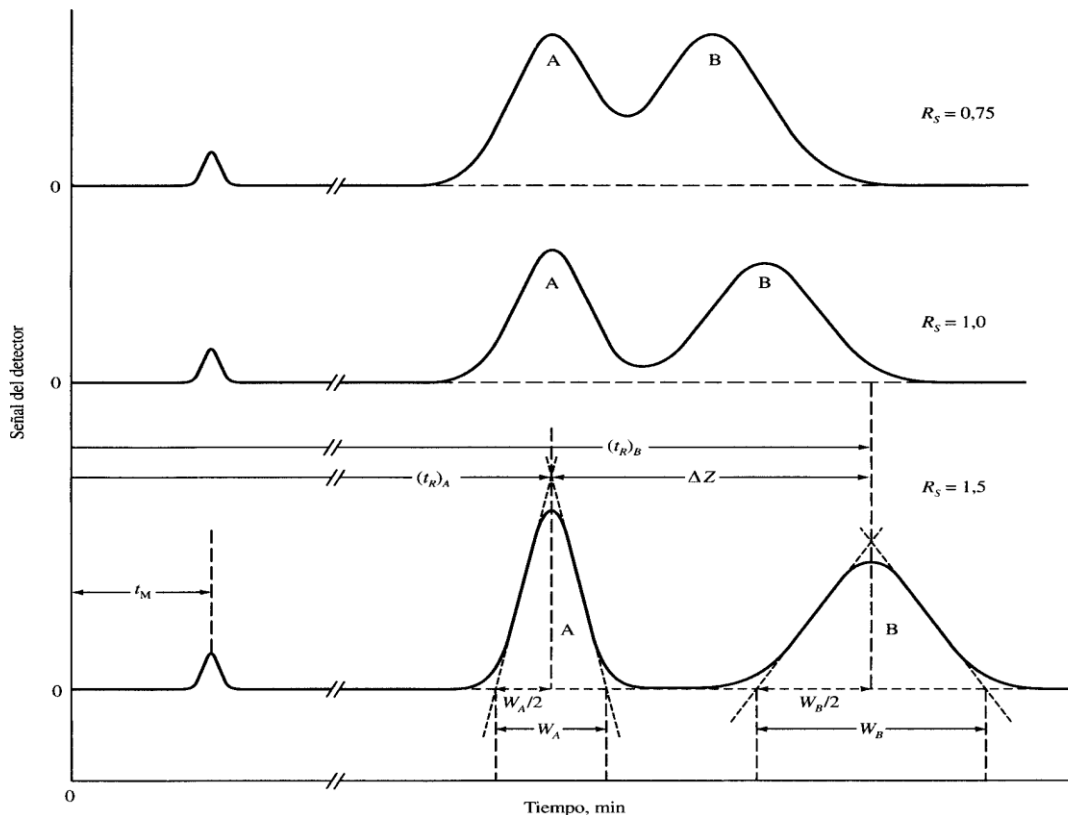


Figura 07. Separaciones correspondientes a tres resoluciones distintas.



Resulta evidente, a partir de la Figura 11, que una resolución de 1.5, permite una separación esencialmente completa de los dos componentes, mientras que no es así con una resolución de 0.75. Con una resolución de 1.0, la zona de A contiene aproximadamente un 4 % de B, y la zona de B contiene una cantidad similar de A. Con una resolución de 1.5, el solapamiento es del orden de un 0.3%. Para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorarse alargando la columna, aumentando así el número de platos. Una consecuencia negativa del aumento del número de platos es el incremento del tiempo requerido para la separación. A menudo es conveniente calcular el número de platos teóricos necesarios para conseguir una determinada resolución.

Muchas veces una separación se puede mejorar significativamente manipulando el factor de retención. Los incrementos de factor de retención generalmente aumentan la resolución (pero a expensas del tiempo de elución). En cromatografía de líquidos, las variaciones de factor de retención se obtienen por variaciones en la composición de la fase móvil durante la elución (elución con gradiente o programación del disolvente).

2.2.4. Aplicaciones de la cromatografía

La cromatografía ha llegado a ser el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí. Además, se puede emplear para identificación cualitativa y para determinación cuantitativa de las especies separadas. Se consideraran algunas de las características generales de la cromatografía como una herramienta para la realización de un análisis.

2.2.4.1. Análisis cualitativo

Un cromatograma proporciona solo un elemento de información cualitativa a cerca de cada una de las especies de la muestra, a saber, su tiempo de retención o su posición en la fase estacionaria tras un cierto periodo de elución. Por supuesto que, a partir de Cromatogramas obtenidos con diferentes fases móviles y estacionarias y a diversas temperaturas de elución, se pueden obtener datos adicionales. A pesar de todo, la cantidad de información que se puede obtener por cromatografía es pequeña comparada con la que proporciona un solo espectro de IR, UV-Visible, RMN, o de masas. Además la longitud de onda espectral o lo datos de frecuencia de los espectros se pueden determinar con mucha más precisión que los equivalentes cromatográficos (t_R).

Lo anterior no significa que la cromatografía carezca de importantes aplicaciones cualitativas, pues está claro que es una herramienta que se utiliza ampliamente para reconocer la presencia o ausencia de componentes en mezclas que



contengan un número limitado de posibles especies de las que se conozca su identidad. Por ejemplo, mediante un cromatograma se pueden detectar, en el hidrolizado de una proteína, 30 o más aminoácidos con un grado de certeza relativamente alto. No obstante, aun así, la confirmación de la identidad requiere la investigación química o espectral de los componentes aislados. Es de subrayar, sin embargo, que una identificación espectroscópica positiva sería normalmente imposible, sobre una mezcla tan compleja como la anterior, sin una separación cromatográfica previa. Por lo tanto, la cromatografía es con frecuencia una etapa vital en los análisis espectroscópicos cualitativos.

Es importante considerar que, aunque los Cromatogramas no conducen a una identificación positiva de las especies presentes en una muestra, proporcionan a menudo la evidencia segura de la ausencia de ciertos compuestos. Así, si en la muestra no aparece un pico con el mismo tiempo de retención que el patrón en las mismas condiciones, se puede asumir que el compuesto en cuestión está ausente (o está presente a una concentración por debajo del límite de detección del procedimiento).

2.2.4.2. Análisis cuantitativo

La cromatografía debe su crecimiento espectacular durante las pasadas cuatro décadas en parte a su rapidez, sencillez, relativamente bajo costo, y a su gran aplicabilidad como herramienta de separación. No obstante, resultaría dudoso que su uso se hubiera extendido tanto si no fuera porque puede también proporcionar información cuantitativa acerca de las especies separadas. Es importante, por consiguiente, tratar algunos de los aspectos cuantitativos aplicables a todos los tipos de cromatografía.

La cromatografía en columna cuantitativa se basa en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la de uno o más patrones. En cromatografía en plano, el área ocupada por las especies separadas sirve como parámetro analítico. Si se controlan las condiciones adecuadamente, esos parámetros varían linealmente con la concentración.

El método más sencillo para el análisis cromatográfico cuantitativo implica la preparación de una serie de disoluciones de patrón de composición parecida a la de la muestra y se representan las alturas o áreas de pico en función de la concentración. Al utilizar este método, la fuente más importante de error en los análisis es normalmente la incertidumbre en el volumen de la muestra; a veces, la velocidad de inyección de la muestra es también un factor a considerar. A menudo, las muestras son pequeñas, y la incertidumbre asociada con la inyección de un volumen reproducible de este tamaño con una microjeringa puede significar



un cierto porcentaje relativo, tal vez de varias unidades. Los errores relativos en el volumen de muestra inyectado se pueden reducir a un 1 0 2% utilizando una válvula rotatoria.

En cromatografía cuantitativa la mayor precisión se consigue por el uso de patrones internos debido a que se evitan las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra. En este procedimiento, se introduce en cada estándar y en la muestra una cantidad exactamente mediad del patrón interno, y la relación de las áreas (o alturas) del analito y del patrón interno sirve como parámetro analítico. Para poder aplicar este método satisfactoriamente, es necesario que el pico del patrón interno este bien separado de los picos de los demás componentes de la muestra ($R_s > 1.25$); por otra parte, el pico del patrón debería aparecer cerca del pico del analito. Con un patrón interno adecuado, se pueden conseguir, normalmente, precisiones relativas mejores que el 1%.

Otro procedimiento que evita las incertidumbres asociadas con la inyección de la muestra es el método de la normalización de las áreas. Es necesario que se produzca la elución completa de todos los componentes de la muestra. En el método de la normalización, se determina las áreas de todos los picos eluidos; tras corregir esas áreas debido a las diferencias en la respuesta del detector a los distintos tipos de compuestos, la concentración del analito se calcula por la relación de su área con el área total de los picos.

Desgraciadamente, en la práctica, es difícil conseguir unas condiciones en la que todos los componentes de la mezcla eluyan en la columna en un periodo de tiempo razonable. Por tanto, el método de la normalización de las áreas tiene aplicaciones limitadas.

2.2.5. Calibración del equipo HPLC

El término de calibración se aplica al ciclo completo de vida de un instrumento, empezando por su desarrollo y fabricación, continuando con su uso y mantenimiento para finalizar con su obsolescencia. El término calificación (verificación) se aplica a la etapa del proceso de calibración dedicada a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto a nivel modular como el sistema completo.

La calibración del instrumento HPLC consta de 5 etapas.

- Etapa 1.- Calificación del fabricante o Calificación del diseño.
- Etapa 2.- Calificación de la instalación.
- Etapa 3.- Calificación de operación.
- Etapa 4.- Calificación de la performance.



- Etapa 5.- Mantenimiento y recalificación.

Calificación del fabricante o Calificación del diseño.- Es necesario un estudio preliminar para ver factibilidad, requerimientos, así como las características del equipo y del proveedor que nos va a suministrar el equipo.

Calificación de la instalación.- Comprende la verificación documentada de que todos los aspectos importantes de la instalación estén en conformidad con las especificaciones del diseño y con las normas reglamentarias.

Calificación de operación.- Comprende la verificación documentada de que los sistemas y subsistemas funcionan de la manera esperada y son capaces de operar en los rangos operativos anticipados. Para lograr esto, es necesario que toda la evaluación deban tener procedimientos escritos, todas las secuencias automáticas deban funcionar repetidamente como lo especificado, toda la instrumentación deberá calibrarse y deberá haber procedimientos para la operación de cada sistema.

Calificación de la performance o calificación de funcionamiento.- Tiene por finalidad demostrar que cada sistema y piezas del equipo realizan la función para la que esta destinado, resultando en componentes, materiales, productos y resultados conforme a las especificaciones de calidad.

Mantenimiento y recalificación.- Después de determinado el tiempo de uso del equipo, las normativas se especifican que deben procederse a realizar las operaciones de mantenimiento especificadas en los protocolos de mantenimiento de equipos, seguidas de una nueva calificación del sistema. El periodo determinado de uso se define como un intervalo de tiempo razonable durante el cual el equipo funciona sin pérdida de especificación.

2.2.5.1. Aptitud del sistema (System Suitability Test)

Las pruebas de aptitud del sistema, son una parte integral de los métodos cromatográficos líquidos, se emplean para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico son aptas para realizar el análisis. La forma más simple de evaluar la aptitud del sistema del HPLC es comparar un cromatograma problema contra la de un estándar. Esto permite una comparación de la forma del pico, ancho del pico y resolución de la línea base. Los parámetros que son calculados experimentalmente para proveer un reporte de evaluación cuantitativa de la adaptabilidad del sistema son:

- Numero de platos teóricos.



- Factor de capacidad.
- Separación o retención relativa.
- Resolución
- Factor de cola o factor de simetría.

2.3. El salvado de arroz

2.3.1. Definición

El salvado de arroz es el subproducto resultante de la etapa de pulido del grano, y representa entre un 8 y 11% del peso total del grano entero. El salvado es una excelente fuente de minerales, proteínas y aceite, además de contener un significativo contenido de vitaminas. El elevado contenido de lípidos, asociado al bajo valor comercial del salvado, justifica su empleo como materia prima de la industria de extracción y refinado de aceites comestibles. Sin embargo, la conservación del salvado de arroz es muy problemática, especialmente debido a la acción enzimática de la lipasa. Los ácidos grasos liberados por la hidrólisis de los triglicéridos proporcionan un sabor ácido y desagradable, comprometiendo la utilización del salvado como aditivo alimentario, y como materia prima para la extracción de aceites comestibles. Por esta razón, la temprana inactivación de la lipasa es esencial para estabilizar el salvado, permitiendo su almacenamiento y utilización como materia prima alimentaria. Además los triglicéridos y otros componentes del aceite se oxidan con facilidad, agregando olores y sabores desagradables, y pérdidas de diversos fotoquímicos de interés para la salud humana.

2.3.2. Productos obtenidos a partir del salvado de arroz

El salvado de arroz es un valioso subproducto porque de él se pueden obtener una variedad de co-productos de gran interés por su contenido de nutrimentos y sustancias bioactivas o nutracéuticas. Se ilustra en la Figura 12 la variedad de co-productos que se obtienen a partir del salvado de arroz, de gran interés para la industria de alimentos, farmacéuticos y cosmética.

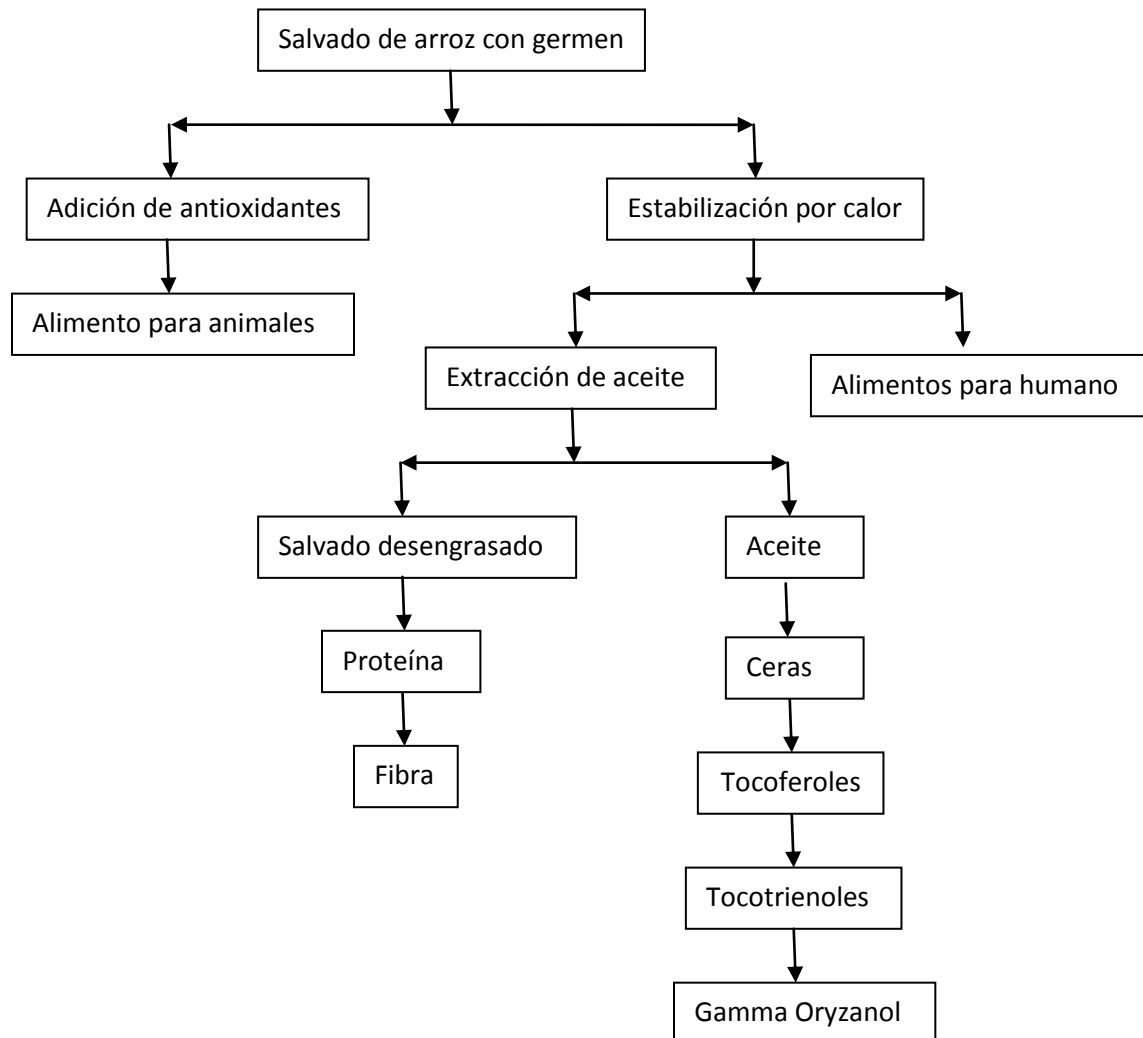


Figura 08. Derivados obtenidos a partir del salvado de arroz con valor agregado.

2.3.3. Aceite de salvado de arroz

Para la extracción industrial de aceite se utiliza una mezcla de salvados de arroz blanco (70%) y vaporizado (30%). Los salvados de arroz blanco y arroz vaporizado proceden del pulido de arrocetes integrales no vaporizados y vaporizados, respectivamente. Los arrocetes integrales se obtienen a partir del arroz “paddy” o bruto, previamente secado y descascarillado. Por su parte, al arroz vaporizado ha sido sometido a un proceso de encharcamiento y tratamiento en



autoclave antes del secado y descascarillado. En ambos casos, el pulido final del grano origina el salvado como subproducto.

Antes de proceder a extraer el aceite, la mezcla de salvados se somete a un proceso de acondicionamiento, que consiste en una etapa de cocido para inactivar las enzimas, seguida de otra de aglomerado o peletizado, que facilita la extracción.

Una vez estabilizado el salvado de arroz cobra un valor agregado de gran interés, primero porque se aumenta su vida útil y además está listo para iniciar su aprovechamiento. Uno de los productos más valiosos es su aceite, cuyo contenido es de 20-25%. Después de extraer el aceite mediante un disolvente, se obtiene el salvado de arroz desengrasado, que normalmente es aprovechado para la elaboración de piensos.

Una vez que es extraído el aceite, es sometido al proceso de refinación, el cual tiene como objetivo eliminar aquellas impurezas y obtener un aceite más limpio. Las etapas del proceso comprenden: desgomado, neutralizado, blanqueo, winterizado, filtrado y desodorizado.

2.3.3.1. Componentes principales del aceite de salvado de arroz

El material lipídico que es extraído del salvado de arroz para hacer aceite de salvado de arroz viene primariamente a partir del germen y las capas externas del grano de arroz en el que existe en forma de gotitas de lípidos. El capítulo sobre los lípidos de arroz por Godber y Juliano en la segunda edición del Arroz: Química y Tecnología (2004) ofrece una amplia discusión de los lípidos que se encuentran en el grano de arroz. Los componentes principales desde el aceite de salvado de arroz, junto con la composición de ácidos grasos se enumeran en la Tabla 02 según lo representado por Godber y Juliano (2004). El aceite de salvado de arroz es similar a otros aceites vegetales con altos niveles de lípidos neutros y cantidades menores de glicolípidos y fosfolípidos. Su perfil de ácidos grasos en comparación con otros aceites vegetales tiende a ser más alto en ácido oleico y bajo en ácido linoleico, similar al aceite de cacahuate en este sentido. El principal ácido graso del aceite de salvado de arroz en comparación con otros aceites vegetales más importantes se muestra en la Tabla 03. Al igual que con la mayoría de los aceites, triacilglicerolos constituyen la mayor parte de los lípidos, aunque el aceite crudo producido a partir de salvado estabilizado tiene niveles más altos de ácidos grasos, mono-y diacilglicerolos debido a las lipasas activos presentes en el salvado. El aceite de salvado de arroz crudo tiende a tener niveles más altos de fosfolípidos, que deben ser eliminadas a través del proceso de refinación. El aceite de salvado de arroz también es único, ya que contiene niveles más altos de cera



(3-9%) y componentes no saponificables (2-5%) que otros aceites vegetales, que pueden causar problemas de procesamiento, pero también puede contribuir a los beneficios para la salud atribuidos al aceite de salvado de arroz.

Tabla 01. Principales clases de lípidos de aceite crudo de salvado de arroz extraído del salvado de arroz crudo y su composición de ácidos grasos

Composición en ácidos grasos (%)										
Clase de lípidos	wt %	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	Saturados	Insaturados
TL (lípidos totales)	20.1	0.4	22.2	2.2	38.9	34.6	1.1	0.6	25.4	74.6
NL (lípidos neutros)	89.2	0.4	23.4	1.9	37.2	35.3	1.1	0.7	26.4	73.6
GL (glicolípidos)	6.8	0.1	27.3	0.2	36.5	35.8	0.2		27.6	72.4
PL (fosfolípidos)	4.0	0.1	22.1	0.2	38.1	39.3	0.2		22.4	77.6

Tabla 02. Composición de ácido graso como un porcentaje del lípido total de aceite de salvado de arroz en comparación con la de maíz, de cacahuete, de soja y aceites de semilla de algodón

Ácidos grasos	Arroz	Maíz	Cacahuete	Soya	Algodón
Mirístico (14:0)	1	0	0	0	0
Palmítico (16:0)	15	8	7	8	21
Esteárico (18:0)	2	4	4	4	2
Oleico (18:1)	45	46	62	28	29
Linoleico (18:2)	35	42	23	54	45
Linolénico (18:3)	1	0	0	5	3
Arraquídico (20:0)	0	0	0	0	1

2.3.3.2. Componentes menores del aceite de salvado de arroz

Uno de los aspectos más positivos del aceite de salvado de arroz es su abundancia de componentes menores, muchos de los cuales se sugiere tiene importantes beneficios para la salud. De hecho, parece que la comunidad científica agrega cuál de los muchos constituyentes menores en el aceite de salvado de arroz se hace responsable por sus beneficios para la salud. Los constituyentes menores con mayor frecuencia se mencionan como importantes, estos son los tocoles, oryzanol, fitoesteroles, y más recientemente, el



policosanoles. La naturaleza y la abundancia de estos componentes se discuten, y posterior, sus beneficios potenciales para la salud se revisan

2.3.3.2.1. Tocolos

El término tocolos se utiliza para incluir tanto los tocoferoles y tocotrienoles. Estas dos clases de compuestos son similares en que ambos contienen una estructura de anillo croman 6 - hidroxil con hasta tres grupos metilo, a la que está unida una cola de fitilo en el segundo carbono. Se diferencian en el hecho de que la cadena lateral fitilo está completamente saturada en tocoferoles, pero tiene tres dobles enlaces conjugados en una disposición en tocotrienoles. El aceite de salvado de arroz crudo tiene una de las concentraciones más altas de los tocolos que cualquier aceite vegetal y generalmente se considera una de las mejores fuentes de tocotrienoles en particular. La Tabla 04, que fue adaptada por Eitenmiller (1997), representa una comparación de aceite de salvado de arroz con varias otras fuentes de tocolos. Como se muestra en esta tabla, en el extremo superior, el aceite de salvado de arroz tiene más tocolos que cualquiera de los otros aceites vegetales comunes, seguidos por el aceite de palma. Sin embargo, ambos de estos aceites contienen generalmente un mayor nivel de tocotrienoles y mucha menor α -tocoferol. Es por eso que el aceite de girasol tiene la actividad de vitamina E más alto (vitamina E equivalentes), incluso a través de él tiene menores tocolos totales, porque casi todos sus tocolos son α -tocoferol, Sin embargo, en los últimos años el importante potencial de los tocotrienoles para la salud, independiente de la su actividad de vitamina E, fue reconocido. Como se discute más adelante, el alto nivel de tocotrienoles del aceite de salvado de arroz se sugiere como una razón para el efecto reductor del colesterol en suero, y la evidencia reciente indica que los tocotrienoles tienen propiedades contra el cáncer.



Tabla 03. Contenido de tocoferoles (T) y tocotrienoles (T3) de aceite de salvado de arroz en comparación con otros aceites vegetales comunes en orden de abundancia descendente.

Aceite	Tocoles totales mg/100g	Vit. E Equiv. mg/100g	%T	%T3	Homólogos primarios más bajos
Arroz	9-160	0.9-41	19-49	51-81	γ -T3, α -T3, α -T, β -T, β -T3
Palma	89-117	21-34	17-55	45-83	α -T, α -T3, γ -T3, γ -T, δ -T
Soya	95-116	17-20	100	0	γ -T, δ -T, α -T
Maíz	78-109	20-34	95	5	γ -T, δ -T, α -T, γ -T3, δ -T3
Canola	65	25	100	0	γ -T, δ -T, α -T, α -T3(tr), β -T3(tr)
Cártamo	49-80	41-46	100	0	γ -T, δ -T, α -T, β -T
Girasol	46-67	35-65	100	0	γ -T, α -T

2.3.3.2.2. Fitoesteroles

Esteroles vegetales, también llamados fitoesteroles, son una amplia clase de compuestos que se informaron para incluir a más de 250 estructuras diferentes esteroides. Ellos son similares en estructura a la del colesterol, la forma más conocida de esteroles encuentra predominantemente en el reino animal, variando principalmente en configuraciones de la cadena lateral y pequeñas diferencias en la estructura de anillo de esteroles. Tres clases de estructuras de esteroles se encuentran en el reino de las plantas sobre la base de la metilación en los cuatro de carbono en la estructura de anillo de esteroles. La forma más común en el reino vegetal es la forma desmetil, con beta-sitosterol como el ejemplo más frecuencia dada. Aceite de salvado de arroz es relativamente único, ya que contiene altas concentraciones de la forma 4,4-dimetil representado por 24-methylenecylcoartanyl. La forma 4 - metil, como en citrostadienol, tiende a ser un componente menor de los lípidos de la planta, incluido el arroz. Además de las diferencias en 4 - carbono, existen otras diferencias entre las estructuras del fitoesteroles que dan lugar a clasificaciones tales como estanoles, que están completamente saturados, y las diferencias en cuanto a la estructura de la cadena lateral para muchas de las diferencias estructurales entre los diferentes tipos de fitoesteroides. Las funciones de los esteroides vegetales parecen ser similares a la del colesterol en los animales que actúan en las membranas celulares como agentes estructurales y de superficie activa y servir como precursores de



hormonas como factores de crecimiento. Una descripción muy completa de la síntesis de esteroles vegetal y la funcionalidad está dada por Piironen *et al.* (2000).

Estos compuestos de fitoesterol pueden existir ya sea como esteroides libres o esterificados con ácidos grasos o ácidos cinámicos, tales como el ácido ferúlico. Ésteres de ácido ferúlico de fitoesteroides están especialmente clasificados como gamma-oryzanol. Hay mucha más información disponible en la literatura relativa a la composición oryzanol de aceite de salvado de arroz que en la composición total de esteroides. Los fitoesteroides también se producen como glucósidos esterílicos (fitoesterol obligado a la glucosa) o glucósidos acilados (esterílicos como fitoesterol unido a la glucosa y de ácidos grasos). Piironen *et al.* (2000) se indica que el aceite de salvado de arroz tiene la más alta concentración de fitoesteroides del aceite vegetal común a 32,25 mg/g en el aceite crudo y 10,55 mg/g en el aceite refinado. Más recientemente, Van Hoed *et al.* (2006) reportaron una concentración de 29,4 mg/g en fitoesteroides totales en el aceite crudo y 21,5 mg/g, 19,2 mg/g, 19,1 mg/g, y 18.3 mg/g en el aceite que se ha neutralizado, blanqueado, des-encerado y desodorizado, respectivamente. Curiosamente, del fitoesterol total en el aceite crudo, aproximadamente 61% eran orizanoles, pero sólo alrededor del 16% de los fitoesteroides en el producto final de aceite eran orizanoles.

2.3.3.2.3. Policosanoles

Policosanol es un término acuñado por los investigadores en Cuba para referirse a un extracto derivado de la cera de la caña de azúcar que era una mezcla de alcoholes de cadena larga. Octacosanol ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{26}\text{-CH}_2\text{-OH}$, C28) es el alcohol predominante que se encuentra en la cera de caña de azúcar, que comprende aproximadamente el 63 % de la mezcla. Otros constituyentes importantes incluyen triacontanol (13 %) y hexacosanol (6 %). Componentes menores incluyen tetracosanol (C24), heptacosanol (C27), nonacosanol (C29), dotriacontanol (C32) y tetratriacontanol (C34). Los beneficios para la salud de policosanol se evaluaron principalmente por científicos cubanos. Ellos encontraron que el policosanol es eficaz en la mejora de los lípidos en suero al reducir el colesterol total (TC) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mientras que aumenta las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sugirieron que el policosanol realiza igual o mejor que estándar farmacéutico utilizados para tratar las anomalías del metabolismo del colesterol, tales como lovastatina y probucol. Además de mejorar el perfil de lípidos en suero, el policosanol modifica varios otros factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares mediante la reducción de la oxidación de LDL, la agregación plaquetaria, y el daño celular endotelial. Sin embargo, estudios recientes producidos contraindicar resultados en comparación con la investigación cubana.



La composición de cera de arroz es diferente de la cera de caña de azúcar, lo más notablemente debido a una menor concentración de octacosanol y una concentración más alta de triacontanol. Un estudio reciente mostró niveles similares de triglicéridos, colesterol total, HDL y colesterol en hámster alimentados con cera de salvado de arroz (una mezcla de policosanol de cera de arroz con el 50% que se convierte en el ácido correspondiente; Traco Labs, Chicago, IL), octa-60 (una mezcla policosanol de cera de caña; Garuda International, Inc., Lemon Grove, CA), y una dieta control. Esta investigación contradice investigaciones previas con policosanoles de cera de la caña de azúcar, que se muestra con el colesterol LDL menor eficacia y aumentar el colesterol HDL en suero, mejorando así la relación HDL / LDL. No se encontraron otros estudios en la literatura dirigida a determinar la eficacia de policosanoles cera de arroz para reducir los niveles de colesterol. Sin embargo, un estudio reciente sugiere que triacontanol solo era similar a la cera de la caña de azúcar policosanol en la alteración de las enzimas metabólicas de colesterol.

2.3.3.2.4. Gamma-Oryzanol

γ -Oryzanol, ya que esta clase de compuestos fue designada originalmente, se pensaba que era un solo compuesto cuando se aísla por primera vez en la década de 1950 a partir de la acción del jabón del refinado de aceite de salvado de arroz (Seetharamaiah y Prabhakar, 1986). Se ha encontrado desde entonces a ser una mezcla de ésteres de esterilo triterpenil y otra de ácido ferúlico (ácido cinámico 4 - hidroxí - 3 - metoxi). Las primeras investigaciones de esta clase de compuestos clasificados como principales ésteres de ferulatos de oryzanol como A, B, y C, que estaban presentes en 1.5 a 2.9 % de aceite de salvado de arroz y tenía un punto de fusión de 138,5°C (Tsuchiya *et al.*, 1957). Consistían en cicloartenil ferulato, llamados oryzanol A, y ferulato 24 - metilencicloartanil, denominan oryzanol C. El oryzanol B se considera una mezcla de oryzanol A y C (Shimizu & Ohta).

Desde temprano se trabajó en la caracterización de la fracción oryzanol de aceite de salvado de arroz, se generó una gran cantidad de interés debido a los beneficios para la salud potenciales que posee (que se discutirá más adelante). Rogers *et al.* (1993) utilizaron cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (HPLC) para separar ferulatos individuales en la fracción de oryzanol. Ellos encontraron que ferulato cicloartenil, 24 - metileno cicloartanil ferulato, y campesteril ferulato eran los ferulatos predominantes en oryzanol, junto con B - sitosterol ferulato, estigmasterol ferulato y cicloartanil ferulato, que es básicamente de acuerdo con el consenso de los informes. Norton (1995) encontró ferulato



ciclobrasil, además de los ferulatos encontrados por Rogers et al. (1993). En su laboratorio, Xu y Godber (1999) encontraron un total de diez ferulatos diferentes de la fracción oryzanol que incluyó cinco ferulatos que no fueron identificados previamente en el salvado de arroz, Δ^7 -stigmasterol, Δ^7 -campesterol, Δ^7 -sitostenol, campestanol y sitostanol. Akihisa *et al.* (2000) proporcionaron información con respecto a la isomerización cis-trans en el enlace de éster de ácido ferúlico y el efecto de la luz sobre la estereoquímica. También identificaron varios ferulatos no identificados previamente como ésteres de ácido ferúlico de 24 metil colesterol, 24 colesterol de metileno y cicloeucalenol.

Considerable variabilidad se observó en la concentración de oryzanol del aceite de salvado de arroz. Roges *et al.* (1993) encontraron que en cinco aceites de salvado de arroz refinados disponibles en el mercado la concentración de oryzanol varió de 0,115 mg/g a 0,787 mg/g, mientras que Norton (1995) encontraron concentraciones de 0,4 y 3,0 mg/g en aceite de salvado de arroz de dos diferentes fuentes comerciales, en comparación con 15,7 mg/g en una preparación de aceite crudo. Como se mencionó anteriormente, el proceso de refinado puede tener un gran impacto en la concentración de oryzanol. Yoon y Kim (1994) encontraron que un aceite en bruto con 1,61 % de oryzanol se redujo a 0,77 % oryzanol por refinación. Xu y Godber (2000) observaron que la concentración de oryzanol en un extracto de hexano de salvado de arroz fue de 9,8 mg/g sin saponificación durante la extracción y 4,6 mg / g con saponificación. Krishna *et al.* (2001) estudiaron la influencia general de la refinación en el contenido de oryzanol en el aceite y encontraron que el aceite sin refinar con ácidos grasos libres 6,8 % tenía 1,86 % oryzanol, que se redujo a 1,84 % después de desgomado, a 1,75 % después de retirar las ceras, y 0,1 % después desacidificación álcali. Más recientemente, el estudio de Van Hoed *et al.* (2006) confirmó el efecto drástico de desacidificación álcali de la concentración de oryzanol, pasando de 1,8g/100g en aceite crudo con 7,53 % de ácidos grasos libres a 0,4g/100g en aceite neutralizado que se redujo a 0,12 % de ácidos grasos libres.

2.3.3.3. Propiedades del aceite de salvado de arroz

En los últimos años varias investigaciones han apuntado a conocer sus propiedades nutricionales y su empleo en la industria farmacéutica y cosmética del aceite de salvado de arroz por ser rica fuente en compuestos fitoquímicos bioactivos.

Varios estudios señalan que el aceite de salvado de arroz contiene lípidos insaponificables principalmente tocoferoles y tocotrienoles, γ -Oryzanol y en menor cantidad compuestos como lecitinas y carotenoides, la flavona tricina, alcoholes de



cadena larga 1-octacosanol y escualeno. La concentración de tocoferoles y γ -Oryzanol dependen de gran medida de factores genéticos y ambientales. Están dentro de rangos de 0.10-0.14 % y 0.9-2.9% respectivamente.

El γ -Oryzanol está compuesto principalmente por ésteres del ácido trans-ferúlico con fitoesteroles (esteroles y alcoholes triterpénicos). La Tabla 05 muestra el aceite de salvado de arroz y sus cantidades de tocoferoles y tocotrienoles. Sin embargo el valor total de tocoferoles (α , β , γ , δ) y de tocotrienoles (α , γ , δ), hace que este aceite se encuentre en una buena clasificación dentro de los aceites vegetales.

Tabla 04. Comparación del contenido de tocoferoles y tocotrienoles (ppm equivalente a mg/kg) en aceite de salvado de arroz y otros aceites vegetales.

Aceite	α - tocoferol	β - tocoferol	γ - tocoferol	δ - tocoferol	α - tocotrienoles	γ - tocotrienoles	δ - tocotrienoles	Total
Canola	272	-	423	-	-	-	-	770
Coco	3	1	1	-	4	-	-	9
Maíz	191	-	942	42	-	-	-	1175
Palma	189	-	-	-	207	405	99	900
Salvado de arroz	347	-	89	42	126	301	10	915
Soya	144	16	870	342	-	-	-	1370
Girasol	608	17	11	-	-	-	-	636
Germen de trigo	1330	71	260	271	26	18	-	1976

Tabla 05. Características fisicoquímicas del aceite de salvado de arroz refinado.

Características	Aceite de salvado de arroz
Gravedad específica (g/ml)	0.916
Índice de refracción	1.470-1.473
Valor de saponificación (KOH, mg/g)	180-190
Valor de yodo (g/ 100g de muestra)	90-108
Punto de humo ($^{\circ}$ C)	243
Materia insaponificable (%)	3-5

El aceite de salvado de arroz posee excelentes características sensoriales y fisicoquímicas como se observa en la Tabla 06. Con respecto a lo sensorial es ligeramente coloreado, limpio de sabor, de agradable olor y buena palatabilidad. Su baja viscosidad permite menos absorción de aceite (20% menos) durante el freído y por lo tanto menos aporte de calorías y disminución de costos de fritura.



Por tener un alto punto de humo (254.4°C), le da buena característica de fritura por que se producen pocos peróxidos, espuma, ácidos grasos libre y polímeros. Químicamente es muy estable debido al equilibrio de sus ácidos linoleico y oleico, al bajo contenido de ácido linoleico y a la presencia de tocoferoles, tocotrienoles y orizanoles como antioxidante, encontraron que el aceite de salvado de arroz presenta buena estabilidad a elevadas temperaturas (200°C), al someterse al proceso de fritura de papas. Este estudio también reporto el aceite de salvado de arroz en mezcla con aceite de girasol muestra excelente características fisicoquímicas en esta temperatura. Otra buena característica del aceite de salvado de arroz es que no es hidrogenado, puesto que este proceso incrementa el contenido de grasas saturadas y además produce formación de ácidos grasos trans.

2.3.3.4. Beneficios para salud del aceite de salvado de arroz y sus constituyentes.

Los habitantes de Japón han utilizado el aceite de salvado de arroz durante muchos años como el aceite de cocina doméstica. El mundo reconoce la salud superior general de la población japonesa y su bajo nivel de enfermedad coronaria en particular. Esto a menudo se utiliza para caracterizar el efecto de " dietas occidentales " en inmigrantes japoneses a los Estados Unidos (Marmot & Syme, 1976). Posiblemente, el uso de aceite de salvado de arroz para cocinar contribuye a esta salud superior, y científicos japoneses han propugnado las propiedades saludables potenciales de aceite de salvado de arroz por un largo tiempo (Susuki & Oshima, 1970). El gobierno de la India inició un programa de promoción del uso del aceite de salvado de arroz en su país como una forma de reducir su dependencia del aceite importado para cocinar (Rukmini & Raghuman, 1991). Como parte de ese programa, la investigación fue financiada para caracterizar los aspectos saludables del aceite de salvado de arroz. Por lo tanto, el trabajo de Rukmini, la iniciativa del científico hindú que participa en este esfuerzo de investigación, junto con sus colegas , es generalmente considerado como el primer esfuerzo bien organizado y se hace pública para entender los potenciales beneficios para la salud del aceite de salvado de arroz (Raghuram & Rukmini, 1995).

Debido a que el principal beneficio de la salud atribuida al aceite de salvado de arroz es que la capacidad para reducir el colesterol sérico, bastante extensa es la investigación que se llevó a cabo en esta propiedad. Yokoyama (2004) proporciona un resumen de los estudios más notables dirigidos a evaluar la capacidad para reducir el colesterol tanto de salvado de arroz y aceite de salvado de arroz. Más recientemente, Clevidence (2007) presenta una interesante visión



general de los datos disponibles en humanos de los relativos efectos realistas de salvado de arroz y aceite en la Conferencia de 2007 de Utilización del arroz en New Orleans, Louisiana. Su presentación y el resumen están disponibles en el sitio web de la Federación de Arroz de EE.UU. (Clevidence, 2007). Ambos autores exploran las diversas teorías para el papel beneficioso del aceite de salvado de arroz, o de sus componentes, en el metabolismo del colesterol.

Yokoyama (2004) señala que la literatura científica japonesa e india informó la evidencia más temprana de la capacidad para reducir el colesterol del aceite de salvado de arroz. Un estudio realizado por Suzuki y Oshima (1970) indicó que una mezcla 70:30 de aceite de salvado de arroz / aceite de cártamo reduce el colesterol en plasma en un 26% en chicas jóvenes sanas. Raghuram *et al.* (1989) utilizaron un grupo de estudio que siguieron durante el curso normal de sus vidas durante treinta días, con la única intervención consiste en la sustitución de su aceite de cocina habitual con aceite de salvado de arroz. Todos los sujetos tenían niveles de colesterol en suero superiores a 225 mg / dl. Ellos encontraron que en el grupo que se utiliza aceite de salvado de arroz (n = 12) en el lugar de su aceite habitual una reducción en el colesterol de suero de 247.6 to 204 a 182,7 mg / dl se produjo después de 15 y 30 días, respectivamente. El grupo de control (n = 9) que continuó a utilizar su aceite habitual tenía ningún cambio en sus niveles de colesterol sérico.

Estos estudios iniciales dieron el impulso para una más amplia evaluación del efecto reductor del colesterol del aceite de salvado de arroz. Sugano y Tsuji (1997) proporcionan un artículo clásico sobre la base de su presentación en la Conferencia Asiática VII de Nutrición: Simposio de Lípidos (que tuvo lugar en Beijing, China, octubre 7-11, 1995), que muy bien resume la investigación que se realiza de la propiedad del aceite de salvado de arroz para reducir el colesterol. Hablaron de la evidencia experimental para el papel de los ácidos grasos frente a la fracción insaponificable, incluidos los tocoles, fitoesteroles, y gamma-oryzanol y sus componentes principales. Desde un punto de vista mecanicista, que estuvieron de acuerdo con la evidencia de que sugiere que el efecto hipercolesterolémico de la materia insaponificable era atribuible a un aumento de la excreción fecal de esteroides a través de la interferencia con la absorción de colesterol.

En los estados unidos, el trabajo del Centro de Investigación Regional del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos con sus siglas en inglés (USDA-Occidental) en Albany, California, recibió la atención nacional y trajo atención al salvado de arroz como alimento potencial health promoting food. Estos investigadores, dirigido por el Dr. Robin Saunders, estaban evaluando el potencial



de salvado de arroz, que es un agente reductor del colesterol en suero similar al salvado de avena, que fue promocionado como un nuevo enfoque de la dieta para el control del colesterol sérico. Sus estudios con hámsteres como modelo experimental indicaron que el salvado de arroz era similar al salvado de avena en la reducción de colesterol en suero (Kahlon *et al.*, 1990). Estos investigadores observaron que el efecto reductor del colesterol de salvado de avena se atribuyó a su fibra soluble (principalmente beta-glucano), pero el salvado de arroz fue mucho más bajo en fibra soluble que el salvado de avena. Por lo tanto, se necesita una explicación alternativa. Una hipótesis era desarrollada: porque el salvado de arroz también fue mayor en los lípidos, o algún componente de la misma puede ser responsable de la propiedad para reducir el colesterol de salvado de arroz (Kahlon *et al.*, 1992.). Desde un punto de vista mecanicista, su investigación se centró también en la fracción insaponificable de aceite de salvado de arroz y sus componentes como los medios primarios para el efecto hipercolesterolémico (Kahlon *et al.*, 1996). Por lo tanto, el material insaponificable en el aceite de salvado de arroz recibió la mayor atención como que promueven la salud potencial.

Entre los muchos componentes de la fracción insaponificable, fitoesteroles (incluyendo gamma-oryzanol) y tocotrienoles son los componentes del aceite de salvado de arroz que fueron estudiados más ampliamente para sus propiedades para reducir el colesterol en suero. Una práctica común es la de incorporar fitoesteroles, o aceites que son ricos en estos compuestos, en la margarina como un medio de concentrados de fuentes de alimentación. En un estudio específico para el aceite de salvado de arroz, normolipidémicos fueron alimentados con una dieta en la que la margarina proporcionó 2,1 g / día de esteroides de aceite de salvado de arroz durante un período de tres semanas. Los investigadores observaron una reducción del 9% en el colesterol en suero a través de este régimen (Vissers *et al.*, 2000).

Sin embargo, el potencial de que las diferentes formas de fitoesteroides pueden afectar los niveles de colesterol en el suero de manera diferente se ha convertido en un problema. La FDA (2008) concedió la condición de declaración de salud calificado para ambos esteroides y estanoles como agentes reductores del colesterol en suero, sin embargo, se requiere un mayor consumo de estanoles (3,4g/día) para hacer la declaración de propiedades saludables de los esteroides (1,3g/día). Aunque la FDA actualmente no hace ninguna distinción entre los di-, mono-y formas desmetil de fitoesteroides en relación con el potencial para reducir el colesterol, la investigación reciente sugiere que la forma de dimetilo, que es la forma predominante de fitoesteroides en el aceite de salvado de arroz, no puede



ser tan efectiva en la prevención de la absorción de colesterol en el intestino (Trautwein *et al.*, 2002). El mecanismo potencial para este se evaluó por Moreau y Hicks (2004) y Nystrom *et al.* (2008) utilizando ensayos *in vitro* que utilizan enzimas pancreáticas de mamíferos. Se postula que la interferencia con la absorción de colesterol se requiere que los ésteres de esteroles vegetales sean hidrolizados a esteroides libres. Sus resultados indican que los ésteres de esteroides de dimetil ferulatos no eran tan eficazmente hidrolizados por las esterasas de colesterol en mamíferos que se evalúan (bovina y porcina).

El caso de los tocotrienoles como agentes reductores del colesterol en suero se estudió extensivamente por Ureshi *et al.* (1986, 1996, 1997, 2000) usando una variedad de fuentes de tocotrienoles, incluyendo cebada, aceite de palma, y salvado de arroz. Una ramificación de este trabajo fue el desarrollo de un suplemento que contenía una nueva forma de tocotrienol que cree que tienen capacidad superior para reducir el colesterol que se deriva de salvado de arroz (Qureshi *et al.*, 1999). La vía principal por la que los tocotrienoles se cree que reducen el colesterol de suero es a través de la reducción de la actividad de la HMG-CoA-reductasa a través de un mecanismo de la inhibición de retroalimentación.

El más reciente y mejor controlado estudio con seres humanos que evalúa el potencial del aceite de salvado de arroz para bajar el colesterol en suero se hizo por Most *et al.* (2005) en el Centro de Investigación Biomédica Pennington, LSU, Baton Rouge, Louisiana. Su estudio fue diseñado para determinar si el efecto reductor del colesterol de salvado de arroz era debido a la fibra o a su componente de aceite. En un experimento, se compararon salvado de arroz desgrasado con una dieta similar que contiene la mitad del contenido de la fibra de una fuente purificada. En un segundo experimento, se comparó una dieta en la que el aceite de salvado de arroz da un tercio de los lípidos, fue con una dieta control que tenía un nivel similar de grasa y perfil de ácidos grasos. Ellos encontraron que el salvado de arroz desengrasado no tuvo ningún efecto sobre los lípidos séricos, pero el aceite de salvado de arroz causa que el colesterol LDL tienda a disminuir de manera significativa por el 7% con ningún cambio en el colesterol HDL. Empezaron a que el aceite de salvado de arroz, no de fibra, era responsable del efecto reductor del colesterol de salvado de arroz con toda la grasa en los individuos ligeramente hipercolesterolémicos, y que este efecto no se debió a un perfil de ácidos grasos, pero era más probable debido a la insaponificable fracción de aceite de salvado de arroz. También en 2005, Berger *et al.* evaluó el efecto de aceite de salvado de arroz con diferentes niveles de gamma-oryzanol (un componente de la fracción insaponificable) sobre el colesterol en suero de



hombres hipercolesterolémicos. Ellos encontraron que el aceite de salvado de arroz, en comparación con el aceite de cacahuete, baja el colesterol sérico total en un 6,3%, el colesterol LDL en un 10,5% y un 18,9% LDL-C/HDL-C, pero que la concentración de gamma-oryzanol del aceite no parecen tener un efecto (Berger et al., 2005). Cicero y Gaddi (2001) determinaron que se necesitaba por lo menos 300 mg de gamma-oryzanol en la dieta para obtener un efecto de disminución de colesterol LDL.

La investigación que se realiza en el USDA Western Regional Research Center 800 Buchanan street en Albany, California, (que fue mencionado como fundamental para aumentar la conciencia sobre el potencial para reducir el colesterol de salvado de arroz) se realizó utilizando hamsters como modelo animal. Los hámsters se utilizan comúnmente evaluando el mecanismo en el suero el potencial para reducir el colesterol de muchas sustancias diferentes, ya que más de cerca imitan el metabolismo del colesterol en los seres humanos. Recientemente, Wilson *et al.* (2007) llevaron a cabo un proyecto de investigación mejor, el objetivo de evaluar el efecto relativo de varios componentes del aceite de salvado de arroz en el metabolismo del colesterol en el hámster. Ellos encontraron que oryzanol tuvo un mayor efecto en la reducción de los niveles de colesterol no HDL en plasma y el aumento de los niveles de colesterol HDL que el ácido ferúlico. Ellos especularon que esto podría ser debido a un aumento en la excreción fecal de colesterol y sus metabolitos. También usando el hámster como modelo animal, Ausman *et al.* (2005) encontraron que el refinado físico del aceite de salvado de arroz que tenía 2-4 % de componentes no triglicérido redujo significativamente el colesterol sérico total y el LDL -C. También encontraron que el aceite de salvado refinado físicamente reduce la absorción de colesterol y aumento de la excreción de esteroides neutros, pero no la excreción de ácidos biliares. Ellos especularon que la reducción de lípidos por el aceite de salvado de refinado físicamente era debido a la reducción de la absorción de colesterol en el intestino, pero no la síntesis hepática de colesterol, probablemente debido a los componentes no triglicérido (por ejemplo, la fracción insaponificable).

En un esfuerzo por identificar un mecanismo potencial para el efecto de salvado de arroz en la diabetes, Chen y Chen (2006) ratas usadas en el que la diabetes de tipo 2 se indujo usando streptozotocin / nicotinamida. Se alimentaron las ratas dietas que contenía aceite de salvado de arroz con diferentes niveles de gamma-tocotrienoles y gamma-oryzanol y los resultados indicaron que las ratas alimentadas con aceite de salvado de arroz tenía una mayor sensibilidad a la insulina, menor triglicérido en plasma, el colesterol LDL en el suero inferior, y el aumento en los receptores de LDL y el aumento de la HMG-CoA reductasa ARNm



en ratas alimentadas con aceite de salvado de arroz hepática. Ellos especularon que las ratas diabéticas, alimentados con las dietas de aceite de salvado de arroz con alto contenido de gamma-oryzanol y tocotrienol gamma habían suprimido hiperlipidemia y respuestas hiperinsulinemia debido a regulación de la síntesis de colesterol y el catabolismo.

La actividad antioxidante in vivo de microencapsulado gamma-oryzanol se evaluó por Suh *et al.* (2005). Manteca de cerdo se utiliza como la fuente de lípidos, con tratamientos de manteca de cerdo fresca, manteca de cerdo tratada con calor, la manteca de cerdo tratada térmicamente con oryzanol añadido (100 ppm), y manteca de cerdo tratada térmicamente con añadió microencapsulado oryzanol (100 ppm) alimentado a ratas en un alto dieta rica en colesterol. Los resultados indicaron que oryzanol microencapsulado fue eficaz en la inhibición de la hipercolesterolemia de suero y el hígado, y también reducen el grado de oxidación de lípidos in vivo y en colesterol.

El potencial del aceite de salvado de arroz o de sus mandantes en la prevención del cáncer es, probablemente, el segundo beneficio potencial para la salud más mencionada después de la reducción del colesterol sérico. Una razón principal de que el aceite de salvado de arroz se cree que tiene potencial de prevención de cáncer está relacionada con su abundancia de antioxidantes, de nuevo, atribuye principalmente a los tocoles y oryzanol. Wada *et al.* (2005) encontraron que la administración oral de tocotrienoles dio lugar a una supresión significativa de hígado y de pulmón carcinogénesis en ratones. Ellos también encontraron que la delta- tocotrienoles ejerce efectos antiproliferativos más significativos que los otros tocotrienoles en comparación con alfa - tocoferol sobre la viabilidad celular, posiblemente debido a la inducción de la apoptosis. Iqbal *et al.* (2004) evaluaron el potencial de una fracción rica en tocotrienol (TRF) preparado a partir de aceite de salvado de arroz en la prevención de la peroxidación lipídica inducida por agentes hepato - cancerígenos. Con base en sus hallazgos, sugieren que el consumo a largo plazo de TRF podría reducir el riesgo de cáncer mediante la prevención de la peroxidación lipídica y el daño de la oxidación de proteínas.

Varios otros medios por los que los componentes del aceite de salvado de arroz podrían tener beneficios potenciales para la salud se encuentran en la literatura reciente. Sen *et al.* (2004) encontraron que los tocotrienoles, especialmente los homólogos delta, en concentraciones nano molares, las neuronas están protegidas por un mecanismo antioxidante independiente y sugirió que los tocotrienoles ingeridos por vía oral podría ser un agente neuroprotector de origen natural. En otra investigación (Nagasaka *et al.*, 2007) utilizando los macrófagos, se



encontró que el ferulato cicloartenil tienen posibles propiedades anti-inflamatorias potenciales.

2.3.4. Panorama mundial de la producción de aceite de salvado de arroz

El aceite de salvado de arroz es popular en varios países tales como Japón, India, Corea, China e Indonesia. Según Sugano, para el año 1997 se consumieron aproximadamente 80.000 toneladas de aceite de salvado de arroz en el Japón. Hoy en día su consumo representa el 3.5% del total de aceites vegetales.

La India es un jugador clave en el mercado mundial de aceites vegetales, por su alto consumo, la mayoría corresponde a aceites de fuentes primarias (oleaginosas). Entre los aceites de fuentes secundarias se destacan los aceites de salvado de arroz, de coco y algodón.

La Compañía NutraCea, empresa líder en investigación de salvado de arroz y su tecnología, ha instalado una planta en China con el objeto de incursionar en el mercado mundial del aceite de salvado de arroz, como alternativa a otros aceites comestibles. La capacidad de producción proyectada es de 500.000 toneladas de aceite de salvado de arroz/año. La industrialización del salvado de arroz ha sido extendido a América del Sur, con la instalación de una planta en Brasil con producción de 70.000 toneladas de aceite de salvado de arroz/año. Según la empresa los costos de producción de este aceite no son significativamente diferentes a los de otros aceites altamente comerciables.

La Compañía NutraCea tiene plantas en los Estados Unidos (California, Louisiana y Montana). También formó alianza con ADM en los Estados Unidos y con empresas en Indonesia, Italia, Austria, México y República Dominicana. De igual manera la empresa Gamma Product, Inc, ubicada en Miami es proveedor líder de aceites de salvado de arroz refinado producido en los Estados Unidos. Continuando con América, México produce 400.000 toneladas de aceite de salvado de arroz/año y Uruguay tiene instalada una planta procesadora de salvado de arroz desde 1993, elabora 80.000 toneladas de arroz paddy y 2500 toneladas de aceite refinado de arroz.

En Europa, la empresa Española de I+D, dedicada exclusivamente desde 1985 a la investigación y desarrollo de productos y tecnología alimentarios, han incursionado en la tecnología de extracción y refinación de aceite de salvado de arroz.

La descripción anterior de una amplia información de la importancia que tiene el aceite de salvado de arroz en el mundo y la gran demanda que tiene, estos son



los hechos que han motivado esta investigación para revalorizar el salvado de arroz como subproducto, extraer su aceite, obteniendo una nueva fuente de aceite vegetal con excelente calidad nutricional y como una alternativa válida para la industria de alimentos y el consumidor.



CAPÍTULO III

PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES



3.1. Descripción del método analítico

Para la determinación de la longitud de onda con la cual se realizó la medición, se utilizó un cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC) con inyector manual y un detector de UV/Visible, todo el sistema cromatográfico marca (Agilent 1100 Series), esté comunicado con una computadora con software ChemStation. Igualmente se utilizó una columna cromatográfica C18 con precolumna o guarda columna para llevar a cabo la separación de los componentes de interés. Una vez determinado el sistema se procedió al ensayo con la preparación de la muestra, la cual fue pesada en una balanza analítica (Ohaus), dichas muestras se disolvieron con acetonitrilo: isopropanol grado HPLC en un Vortex Mixer por agitación para ser separadas en fases con una centrifuga (Labnet) para su posterior valoración.

Se utilizaron solventes grado HPLC como son acetonitrilo, metanol e isopropanol para llevarse a cabo las fases móviles y el disolvente de la muestra así como un patrón interno estándar de gamma-Oryzanol, marca Accustards pureza (100%) Tech mix. Los componentes predominantes que lo constituyen: Cicloartenil ferulato ($C_{40}H_{58}O_4$), 24-Metileno cicloartenil ferulato ($C_{41}H_{60}O_4$), Δ^7 -Campestenil ferulato + Campesteril ferulato ($C_{38}H_{56}O_4$) + ($C_{38}H_{56}O_4$) y Δ^7 -Sitostenil ferulato + β -Sitosteril ferulato ($C_{39}H_{58}O_4$) + ($C_{39}H_{58}O_4$). El patrón interno fue usado para llevarse a cabo el proceso de validación del método y determinar así los parámetros de validación.

3.1.1. Condiciones ambientales

Todas las condiciones de la validación se efectuaron en las condiciones controladas de temperatura y humedad del laboratorio.

3.1.2. Preparación de solventes

- Solución A.- Acetonitrilo: Metanol: Isopropanol (30:65:5 v/v).
Tomar una probeta de 1000 ml y adicionar 300ml de acetonitrilo seguido de 650ml de metanol y aforar con 50ml de Isopropanol.
- Solución B.- Acetonitrilo: Metanol: Isopropanol (50:40:10 v/v).
Tomar una probeta de 1000 ml y adicionar 500ml de acetonitrilo seguido de 400ml de metanol y aforar con 100ml de Isopropanol.
- Solución de Isopropanol: Acetonitrilo (7:3 v/v).
Tomar una probeta de 100ml y adicionar 70ml de Isopropanol y aforar con 30ml de acetonitrilo.



3.1.3. Preparación del estándar

Se pesaron 52.50 mg de estándar de gamma-Oryzanol 100% tech mix en un matraz volumétrico de 2 ml equivalente a 0.0020 L y se disolvió con la solución de Isopropanol: Acetonitrilo (7:3 v/v) para obtener una solución madre de 26,250 ppm. A partir de esa solución madre parten las soluciones de trabajo o curva de calibración. Ver anexo B.

3.1.4. Preparación de la muestra

Primeramente todo material que este en contacto con la muestra debe estar bien lavado y seco. Se realizó el muestreo siguiendo los lineamientos de un plan HACCP, se procedió a registrar la muestra dentro de las bitácoras de recepción de muestras asignándole así un número de control.

Se pesó una porción de 500 mg de muestra representativa para la realización del análisis, para el estudio de % de recuperación se adiciono una alícuota de estándar a una concentración y volumen conocido.

Se Procedió a realizar una dilución de la muestra con 5 ml de una solución de Isopropanol: Acetonitrilo, la cual se mantuvo a una agitación por 1 minuto. Después de la agitación se sometió la muestra a centrifugación durante 6 minutos a 3000 RPM, se tomó una alícuota del sobrenadante y finalmente se realizó el filtrado por filtro de membrana de PTFE modificada antes de proceder a las inyecciones al equipo cromatográfico.

3.1.5. Procedimiento o desarrollo del método de análisis

Para proceder a describir el procedimiento, se dará una advertencia acerca de las interferencias que puedan afectar el análisis de gamma-Oryzanol.

El análisis de Gamma-Oryzanol está sujeto a interferencias causadas por contaminantes propios de la muestra, de solventes y de todo aquel material que entre en contacto con la muestra, las interferencias pueden resultar, en el cromatograma, en elevaciones de la línea base o picos desconocidos que interfieran en la identificación del analito. Se debe demostrar que los solventes y el material están libres de contaminantes, realizando blancos en las mismas condiciones de operación del análisis en cuestión.

El análisis de los componentes mayoritarios del Gamma-Oryzanol se llevo a cabo con las siguientes condiciones cromatográficas:

- Flujo de 1 ml. de fase móvil.



- Columna C18 (2) de 250 mm X 4.6 mm X 5µm) con guarda columna instalado.
- Detector UV-VWD a una longitud de onda de at 325 nm.
- Temperatura de compartimiento de columna 25°C.
- Fase móvil iniciando con solución B durante 10 minutos y luego una rampa o gradiente lineal de tal forma que en 15 minutos quede solución de A al 100%.
- Volumen de inyección de 20 µL.

El método de cálculo para identificar y cuantificar los analitos será el que provenga de la curva de calibración inyectada, este método de cálculo para el caso del Gamma-Oryzanol se cuenta con los picos de interés de cada componente proveniente de un estándar, a fin de identificar los analitos presentes en las muestras inyectadas.

Este método compara el tiempo de retención vs el tiempo de retención de los picos previamente identificados de la curva de calibración. Si el tiempo de retención y el pico de una muestra corresponden al tiempo y pico del estándar, entonces la identificación es considerada como positiva y se procede a cuantificar en base a la curva de calibración.

3.2. Establecimiento de las condiciones y alcance de la validación

3.2.1. Establecimiento de las condiciones de la validación

El laboratorio responsable del análisis o ensayo debe definir las condiciones de la validación de acuerdo a lo definido en las guías de validación de métodos analíticos y a su caso en particular.

3.2.2. Establecimiento del alcance de la validación

Se diferencian tres casos en particular, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero:

- 1.- Se trata de un método de ensayo estandarizado y normalizado, que se aplica exactamente como esta descrito en la norma/procedimiento.
- 2.- Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado o cuando se use un método proporcionado por el proveedor de un equipo o sistema analítico.
- 3.- Se trata de un método de ensayo desarrollado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos.



3.2.3. Clasificación de la validación según el tipo de procedimiento de ensayo

3.2.3.1. Método de ensayo normalizado

Comprobación de que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.

3.2.3.2. Método de ensayo no normalizado

Comprobación de que la modificación introducida en el método original no afecta la capacidad del laboratorio para proporcionar resultados confiables.

3.2.3.3. Métodos desarrollados

Comprobación de que el método cumple con las características necesarias para dar resultados confiables para el fin propuesto.

3.2.4. Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba

1.- Métodos normalizados

Parámetros de desempeño	Métodos Normalizados			
	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas
Selectividad/Especificidad	Si	+	+	+
Estabilidad de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del sistema	No	Si	Si	+
Linealidad del método	No	+	+	+
Rango	No	+	+	+
Exactitud	No	Si	Si	+
Repetibilidad	No	Si	Si	Si
Precisión intermedia	No	Si	Si	Si
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	+	No	No	No
Límite de Cuantificación	No	+	+	+
Robustez	+	+	+	+

+ Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.

++ dependerá de la disponibilidad de laboratorios.



2.- Métodos no normalizados

Parámetros de desempeño	Métodos No Normalizados			
	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas
Selectividad/Especificidad	Si	+	+	+
Estabilidad de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del sistema	No	Si	Si	+
Linealidad del método	No	Si	Si	+
Rango	No	Si	Si	+
Exactitud	No	Si	Si	+
Repetibilidad	No	Si	Si	Si
Precisión intermedia	No	Si	Si	Si
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	+	No	No	No
Límite de Cuantificación	No	+	Si	+
Robustez	+	+	+	+

+ Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis o de las modificaciones que se le hagan al método.

++ Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

3.- Método desarrollado

Parámetros de desempeño	Métodos Desarrollados			
	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas
Selectividad/Especificidad	Si	Si	Si	+
Estabilidad de la muestra	Si	Si	Si	+
Linealidad del sistema	No	Si	Si	+
Linealidad del método	No	Si	Si	+
Rango	No	Si	Si	+
Exactitud	No	Si	Si	+
Repetibilidad	No	Si	Si	Si
Precisión intermedia	No	Si	Si	Si
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	Si	No	+	No



Límite de Cuantificación	No	+	Si	+
Robustez	+	Si	Si	+

+ Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.

++ Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

3.2.5. Seleccionar el tipo de matriz a evaluar

La matriz a evaluar se selecciona conforme a:

- La más solicitada.
- La más compleja.
- Para métodos generales que apliquen a diferentes matrices, se debe seleccionar una matriz representativa por grupo (alimentos, principio activo, tipo de presentación, entre otros).

3.2.6. Determinar los parámetros de desempeño a evaluar

Parámetro	Muestras	Repeticiones	Determinar
Intervalo lineal	Blancos de muestra o muestras adicionadas Mínimo 5 niveles diferentes de concentración	Cada nivel por triplicado	a) Graficar respuesta analítica (y) vs nivel de concentración adicionada (x). b) Confirmar visualmente la existencia de linealidad del intervalo.
Observaciones			
a) Utilizar niveles establecidos en la curva de calibración. b) Los niveles de concentración deben estar igualmente espaciados en el intervalo de interés. c) Considerar en el intervalo el valor de la especificación y/o los valores de aceptación y rechazo y estar en la medida de lo posible al centro de este. d) Reportar el intervalo de concentraciones obtenido en las unidades establecidas por el método.			
Parámetro	Muestras	Repeticiones	Determinar



Intervalo de trabajo	Blancos de muestra o muestras adicionadas Mínimo 5 niveles diferentes de concentración	Cada nivel por triplicado	<ul style="list-style-type: none"> a) Considerar los niveles que cumplen con los criterios de recuperación y repetibilidad establecidos. b) Graficar la concentración obtenida (y) vs la concentración adicionada (x). c) Calcular la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (r).
Observaciones			
<ul style="list-style-type: none"> a) Utilizar los datos obtenidos en la estimación del intervalo lineal. b) Reportar el intervalo de concentraciones obtenido en las unidades establecidas por el método. 			
Parámetro	Muestras	Repeticiones	Determinar
Límite de detección y cuantificación	Blancos de muestra o muestras adicionadas Mínimo 5 niveles diferentes de concentración	Cada nivel por triplicado	<ul style="list-style-type: none"> a) Calcular la pendiente (m) y la desviación estándar de la ordenada al origen (sb_0) de la respuesta analítica (y) vs nivel de concentración adicionado (x). b) Estimar los límites con las siguientes ecuaciones: $LD = \frac{3.3 * sb_0}{m}$ $LC = \frac{10 * sb_0}{m}$
Observaciones			

- a) Utilizar niveles establecidos en la curva de calibración.
- b) Los niveles de concentración deben estar igualmente espaciados en el intervalo de interés.
- c) Considerar en el intervalo el valor de la especificación y/o los valores de aceptación y rechazo y estar en la medida de lo posible al centro de este.
- d) Reportar el intervalo de concentraciones obtenido en las unidades establecidas por el método.

Parámetro	Muestras	Repeticiones	Determinar
Recuperación y sesgo	Blancos de muestra o muestras adicionadas Mínimo 5 niveles diferentes de concentración	Cada nivel por triplicado	a) Calcular la concentración recuperada para cada nivel de concentración adicionado. b) Para el sesgo, efectuar la resta aritmética de la concentración añadida menos la concentración recuperada.
Observaciones			
<ul style="list-style-type: none"> a) Utilizar los datos obtenidos en la estimación del intervalo de trabajo. b) Reportar la recuperación como intervalo en % y el sesgo como intervalo en las unidades establecidas por el método. 			
Parámetro	Muestras	Repeticiones	Determinar

<p>Repetibilidad</p>	<p>Blancos de muestra o muestras adicionadas</p> <p>Tres niveles diferentes de concentración (niveles inferior, medio y superior estimado en el intervalo de trabajo)</p>	<p>Cada nivel por sextuplicado</p>	<p>a) Analizar las muestras por un mismo analista (analista 1) en dos días diferentes (3 niveles/triplicado/día).</p> <p>b) Calcular el % de recuperación de los 6 resultados para cada nivel.</p> <p>c) Calcular la media, desviación estándar y el coeficiente de variación de los % de recuperación obtenidos para cada nivel adicionado.</p>
<p>Observaciones</p>			
<p>a) Utilizar la información obtenida en la estimación del intervalo de trabajo como los datos para el día 1 (cada nivel por triplicado por día).</p> <p>b) Reportar la desviación estándar (Sr) o coeficiente de variación (CVr) máximos obtenidos.</p> <p>c) Si no se cuenta con dos analistas o dos equipos para estimar la reproducibilidad, estimar la reproducibilidad con el mismo analista pero utilizando un tercer día.</p>			
<p>Parámetro</p>	<p>Muestras</p>	<p>Repeticiones</p>	<p>Determinar</p>

<p>Reproducibilidad (Precisión intermedia)</p>	<p>Blancos de muestra o muestras adicionadas</p> <p>Tres niveles diferentes de concentración (niveles inferior, medio y superior estimado en el intervalo de trabajo)</p>	<p>Cada nivel por sextuplicado</p>	<p>a) Analizar las muestras en 2 días diferentes (3 niveles/triplicado/día) y por un analista diferente (analista 2).</p> <p>b) Calcular el % de recuperación de los 6 resultados para cada nivel.</p> <p>c) Combinar estos resultados con los datos obtenidos en la estimación de la repetibilidad y calcular la media, desviación estándar y el coeficiente de variación de los % de recobro para cada nivel.</p>
<p>Observaciones</p>			
<p>Reportar la desviación estándar (S_R) o coeficiente de variación (CV_R) máximos obtenidos.</p>			
<p>Parámetro</p>	<p>Muestras</p>	<p>Repeticiones</p>	<p>Determinar</p>
<p>Sensibilidad</p>	<p>Blancos de muestra o muestras adicionadas</p> <p>Mínimo 5 niveles diferentes de concentración</p>	<p>Cada nivel por triplicado</p>	<p>a) Graficar la respuesta analítica (y) vs la concentración adicionada (x)</p>
<p>Observaciones</p>			
<p>a) Utilizar los datos obtenidos en la estimación del intervalo de trabajo.</p> <p>b) Reportar la relación entre el cambio de respuesta analítica por unidad de concentración.</p>			
<p>Parámetro</p>	<p>Muestras</p>	<p>Repeticiones</p>	<p>Determinar</p>
<p>Selectividad</p>	<p>Blancos de muestra o muestras adicionadas con cantidad conocida de interferencias,</p>	<p>Por duplicado</p>	<p>Evaluar si la presencia de la interferencias, impurezas o productos de degradación inhiben o incrementan la detección del analito</p>



	producto de degradación o impurezas		
Observaciones			
<p>Pueden emplearse técnicas confirmatorias para asegurar la identidad del analito. Cuando no se tienen estándares de interferencia o impurezas se pueden aplicar las siguientes condiciones de degradación:</p> <p>a) Temperatura: 70-120°C o 20°C por debajo de su punto de fusión, durante 2 a 4 semanas.</p> <p>b) Luz UV, luz fluorescente y/o humedad relativa por un tiempo apropiado.</p> <p>c) pH 1 a 2 y/o 10 a 12 someterlas a 60-80°C por un tiempo apropiado.</p> <p>d) Para líquidos y semisólidos adicionar peróxido de hidrogeno.</p>			
Parámetro	Muestras	Repeticiones	Determinar
Robustez	<p>Blancos de muestra o muestras adicionadas</p> <p>Concentración equivalente al nivel medio estimado en el intervalo de trabajo</p>	8 muestras por duplicado	<p>a) Identificar de 4 a 7 factores que puedan tener un efecto significativo en el desempeño del método y variar ligeramente cada uno de ellos.</p> <p>b) Efectuar una serie de 8 combinaciones de valores nominales con variaciones deliberadas.</p> <p>c) Analizar una muestra por duplicado con cada serie de combinaciones.</p> <p>d) Calcular las diferencias de las mediciones de los subgrupos.</p> <p>e) Graficar en una línea los valores de la diferencias de menor a mayor.</p> <p>f) Calcular la desviación estándar de las diferencias.</p>
Observaciones			
<p>a) Reportar los factores que más influyen en el resultado final.</p> <p>b) Establecer si el método es robusto frente a las variaciones establecidas.</p>			



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



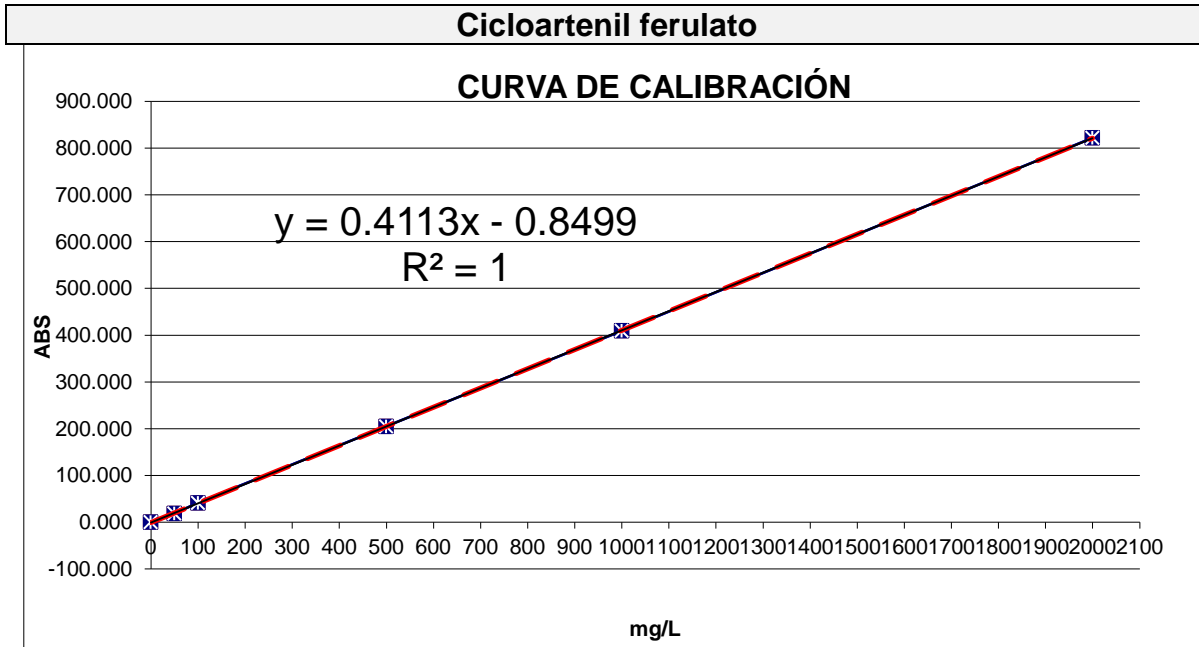
4.1. Resultados

Rango de curva de calibración

Código de perfil	Parámetro de curva	ALTURA (mAU) DE LOS COMPONENTES				ABS
		Cicloartenil ferulato	24-Metileno cicloartenil ferulato	Λ 7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato	Λ 7-Sitostenil ferulato + β -Sitosteril ferulato	TOTAL (mAU)
G-ORY000025	50 ppm	18.19695	29.522775	6.21720	3.03655	56.97344
G-ORY000026		18.52381	29.66829	6.39074	3.00050	57.58334
G-ORY000027		18.17577	29.18906	6.31542	2.94508	56.62534
G-ORY000028	100 ppm	41.07276	65.84569	13.93093	6.60825	127.45762
G-ORY000029		41.05693	65.91100	13.93982	6.62667	127.53442
G-ORY000030		41.45148	66.54964	13.84207	6.64470	128.48789
G-ORY000031	500 ppm	205.95985	329.97849	70.24894	33.48498	639.67226
G-ORY000032		206.41643	330.75983	70.40588	33.49200	641.07414
G-ORY000033		202.59094	324.32761	67.53126	32.63511	627.08492
G-ORY000034	1000 ppm	408.47879	654.11444	139.75682	66.59995	1268.95000
G-ORY000035		411.33264	658.85217	140.77608	67.10135	1278.06224
G-ORY000036		408.87000	654.96558	139.93932	66.68285	1270.45773
G-ORY000037	2000 ppm	822.82306	1314.75012	283.62054	136.33371	2557.52744
G-ORY000038		819.45392	1310.80457	282.74515	135.88132	2548.88495
G-ORY000039		824.39777	1317.28113	284.17438	136.50201	2562.35529

Linealidad del sistema

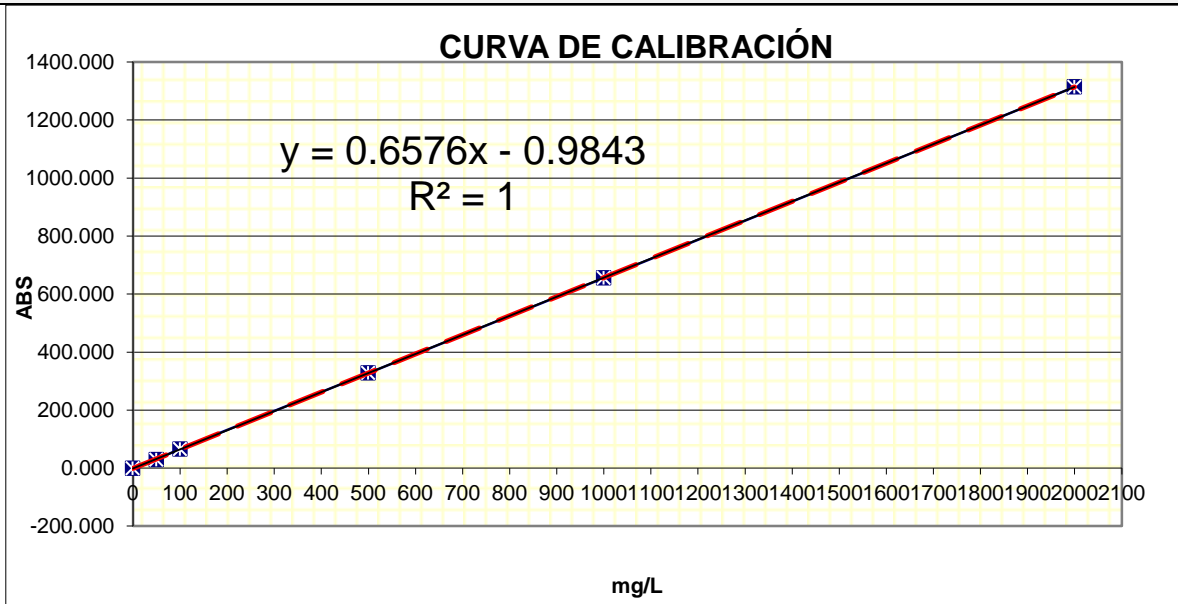
Cicloartenil ferulato						
Estándar mg/L	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
Blanco	0	0	0	0		
50	18.299	18.197	18.524	18.176	$m =$	0.4113
100	41.194	41.073	41.057	41.451	$b =$	-0.8499
500	204.989	205.960	206.416	202.591	$r =$	1.0000
1000	409.560	408.479	411.333	408.870	$r^2 =$	1.0000
2000	822.225	822.823	819.454	824.398		



24-Metileno cicloartenil ferulato						
Estándar mg/L	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
Blanco	0	0	0	0		
50	29.460	29.523	29.668	29.189	$m =$	0.6576
100	66.102	65.846	65.911	66.550	$b =$	-0.9843
500	328.355	328.355	330.760	324.328	$r =$	1.0000
1000	655.977	654.114	658.852	654.966	$r^2 =$	1.0000
2000	1314.279	1314.750	1310.805	1317.281		



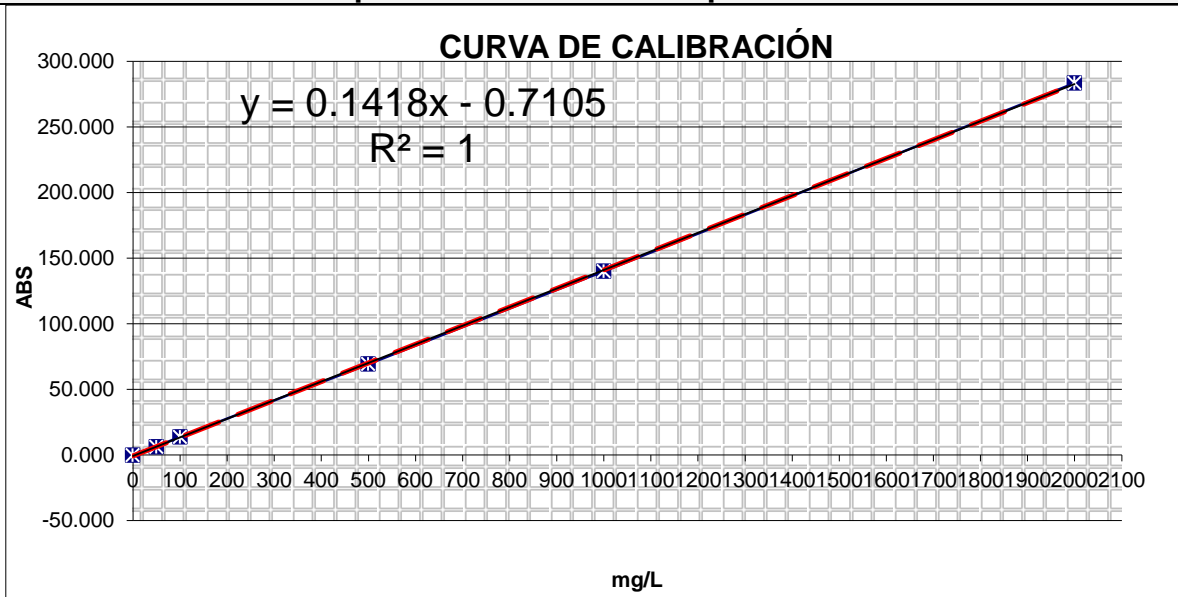
24-Metileno cicloartenil ferulato



Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato

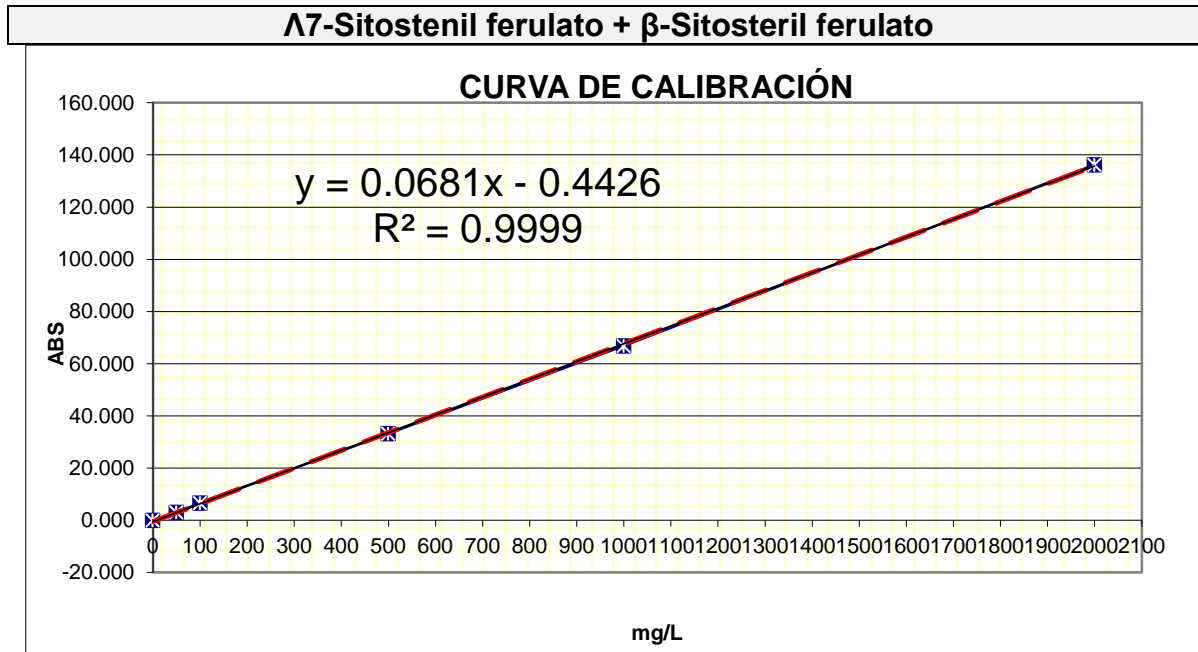
Estándar mg/L	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
Blanco	0	0	0	0		
50	6.308	6.217	6.391	6.315	$m =$	0.1418
100	13.904	13.931	13.940	13.842	$b =$	-0.7105
500	69.394	70.249	70.406	67.531	$r =$	1.0000
1000	140.157	139.757	140.776	139.939	$r^2 =$	1.0000
2000	283.513	283.621	282.745	284.174		

Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato



Λ7-Sitostenil ferulato + β-Sitosteril ferulato

Estándar mg/L	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
Blanco	0	0	0	0		
50	2.994	3.037	3.001	2.945	$m =$	0.0681
100	6.627	6.608	6.627	6.645	$b =$	-0.4426
500	33.204	33.485	33.492	32.635	$r =$	1.0000
1000	66.795	66.600	67.101	66.683	$r^2 =$	0.9999
2000	136.239	136.334	135.881	136.502		



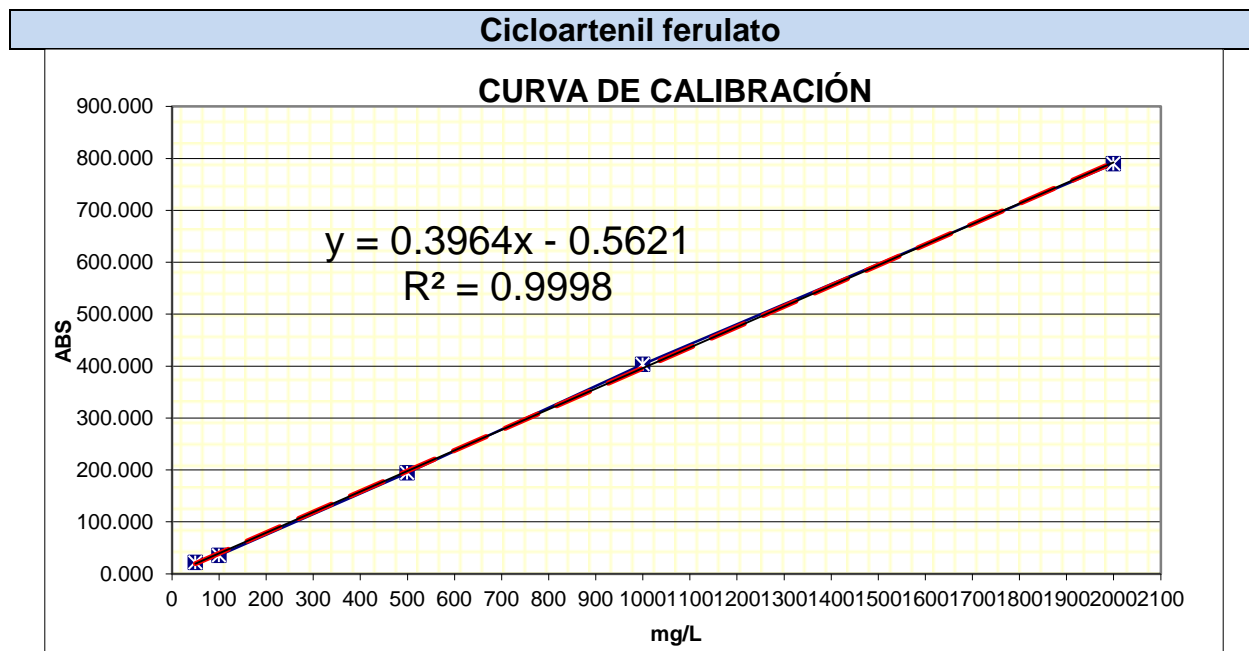
Rango de curva de trabajo

Código de perfil	Parámetro de curva	ALTURA (mAU) DE LOS COMPONENTES				ABS
		Cicloartenil ferulato	24-Metileno cicloartenil ferulato	Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato	Λ7-Sitostenil ferulato + β-Sitosteril ferulato	TOTAL (mAU)
G-ORY000063	50 ppm	20.550	31.487	13.231	4.120	69.338
G-ORY000064		22.031	31.949	13.284	4.921	72.185
G-ORY000065		21.595	31.461	12.823	4.788	70.667
G-ORY000075	100 ppm	35.308	55.234	13.039	6.019	109.600
G-ORY000076		35.216	55.195	14.649	5.984	111.044
G-ORY000077		35.657	55.724	14.035	6.134	111.550
G-ORY000087	500 ppm	190.423	208.623	59.580	29.111	487.737
G-ORY000088		195.904	296.670	62.893	30.157	585.624
G-ORY000089		197.232	298.283	63.286	30.268	589.069
G-ORY000099	1000 ppm	397.818	612.617	122.340	61.645	1194.420
G-ORY000100		406.371	622.393	134.892	62.190	1225.846
G-ORY000101		405.990	619.168	132.990	61.501	1219.649
G-ORY000110	2000 ppm	783.997	1224.832	248.246	131.493	2388.568
G-ORY000111		787.860	1227.538	248.542	131.552	2395.492
G-ORY000112		796.410	1240.401	250.466	132.756	2420.033



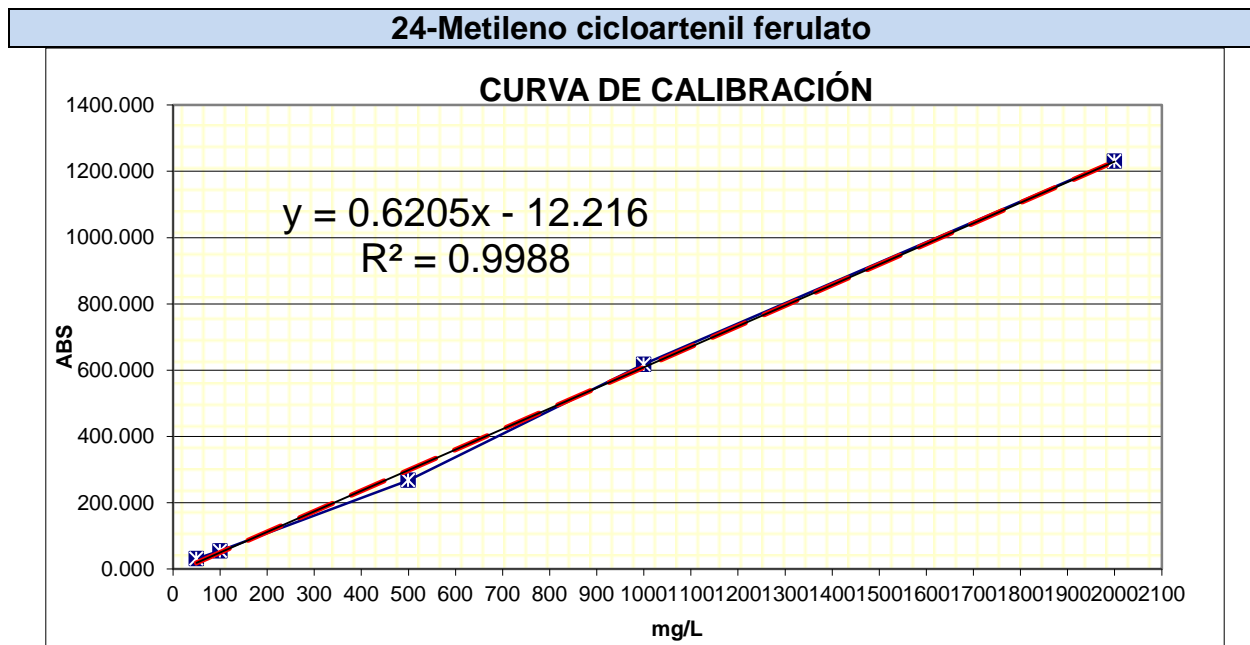
Linealidad del método.

Cicloartenil ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
Blanco	0	0	0	0		
50	21.392	20.550	22.031	21.595	m =	0.3664
100	35.394	35.308	35.216	35.657	b =	-0.5621
500	194.520	190.423	195.904	197.232	r =	0.9999
1000	403.393	397.818	406.371	405.990	r ² =	0.9998
2000	789.422	783.997	787.860	796.410		



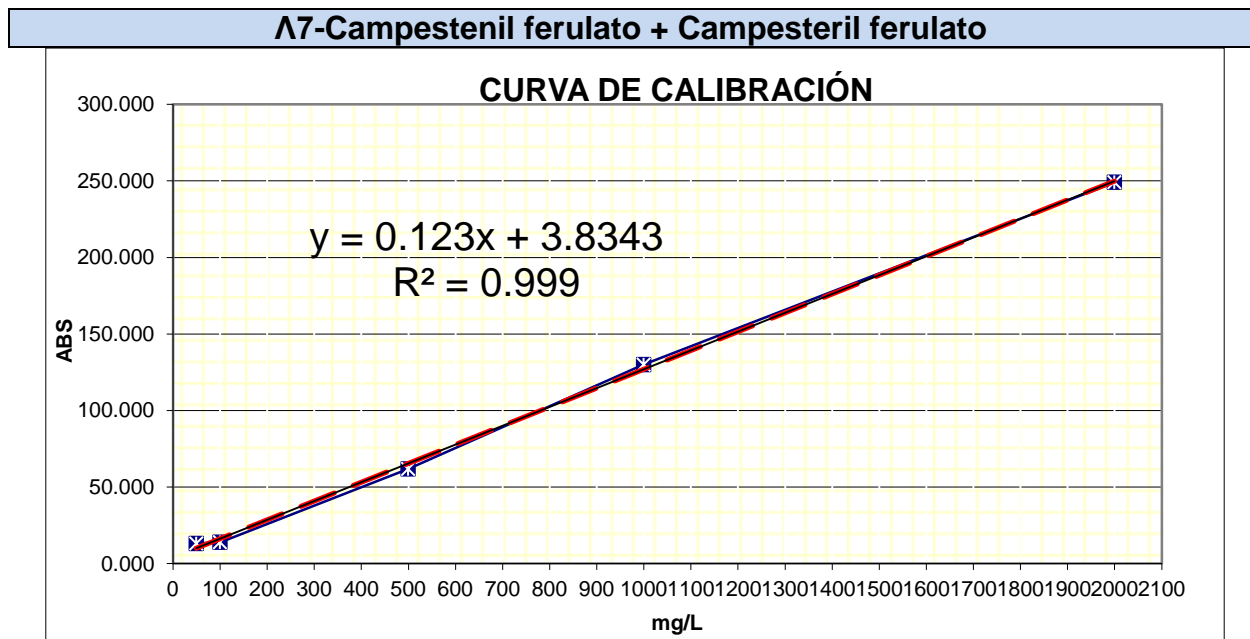


24-Metileno cicloartenil ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
		0	0	0		
Blanco	0	0	0	0		
50	31.632	31.487	31.949	31.461	$m =$	0.6205
100	55.384	55.234	55.195	55.724	$b =$	-12.2161
500	267.859	208.623	296.670	298.283	$r =$	0.9994
1000	618.059	612.617	622.393	619.168	$r^2 =$	0.9988
2000	1230.924	1224.832	1227.538	1240.401		



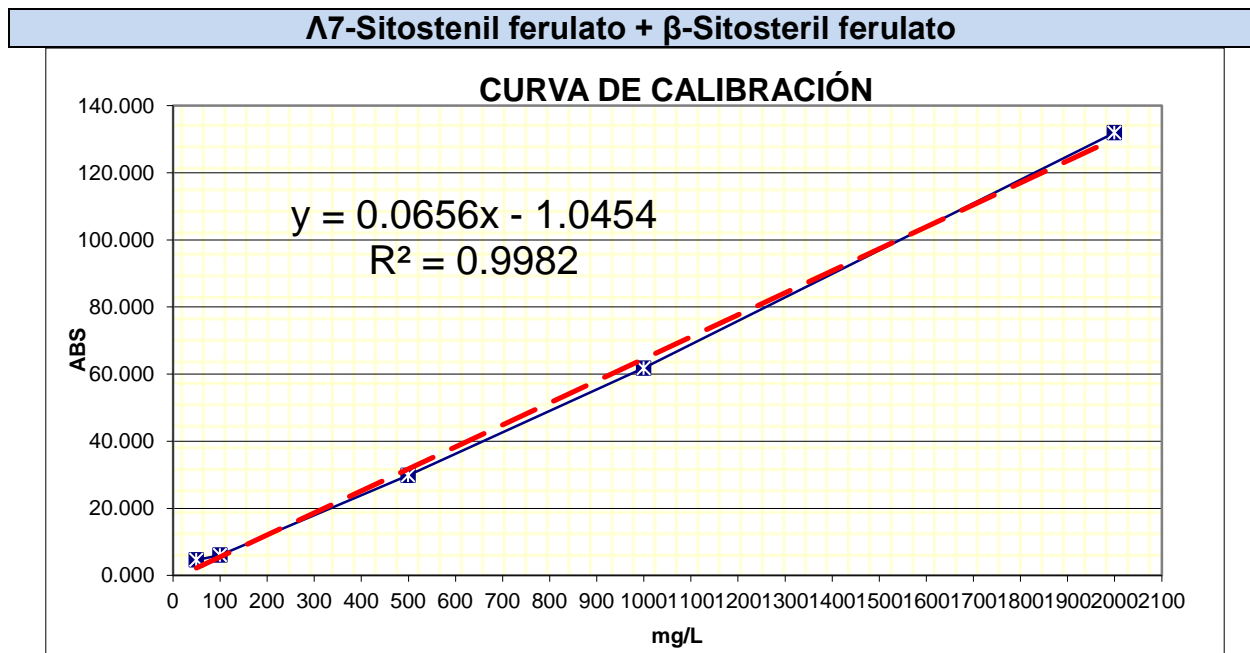


Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
Blanco	0	0	0	0		
50	13.112	13.231	13.284	12.823	$m =$	0.1230
100	13.908	13.039	14.649	14.035	$b =$	3.8343
500	61.920	59.580	62.893	63.286	$r =$	0.9995
1000	130.074	122.340	134.892	132.990	$r^2 =$	0.9990
2000	249.085	248.246	248.542	250.466		





A7-Sitostenil ferulato + β -Sitosteril ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
		0	0	0		
Blanco	0	0	0	0		
50	4.610	4.120	4.921	4.788	$m =$	0.0656
100	6.045	6.019	5.984	6.134	$b =$	-1.0454
500	29.845	29.111	30.157	30.268	$r =$	0.9991
1000	61.779	61.645	62.190	61.501	$r^2 =$	0.9982
2000	131.934	131.493	131.552	132.756		





Límite de Detección (LC) y Límite Cuantificación (LC)

Cicloartenil ferulato				
Curva de calibración. Datos experimentales				
Estándar mg/L	Alturas (Y)			Promedio ABS
50	18.197	18.524	18.176	18.299
100	41.073	41.057	41.451	41.194
500	205.960	206.416	202.591	204.989
1000	408.479	411.333	408.870	409.560
2000	822.823	819.454	824.398	822.225
Pendiente de la recta m=	0.411572		Coefficiente de correlación r=	1.0000
Ordenada al origen b=	-1.19420		Coefficiente de determinación r²=	1.0000
$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$ $S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}$ $S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X - \bar{X})^2}}$				
S_{Y/X}= 0.9480 Sb= 0.0004 Sa= 0.3915				
Y_B= b				
LD y LC en unidades de absorbancia.				
Y_{LD}= Y_B+ 3S_{Y/X}			Y_{LD}= 1.650	
Y_{LC}= Y_B+ 10S_{Y/X}			Y_{LC}= 8.286	
LD y LC en unidades de concentración.				
X_{LD}= Y_{LD} - b / m			X_{LD}= 6.91 µg/L	
X_{LC}= Y_{LC} - b / m			X_{LC}= 23.03 µg/L	



24-Metileno cicloartenil ferulato				
Curva de calibración. Datos experimentales				
Estándar mg/L	Alturas (Y)			Promedio ABS
50	29.523	29.668	29.189	29.460
100	65.846	65.911	66.550	66.102
500	328.355	330.760	324.328	328.355
1000	654.114	658.852	654.966	655.977
2000	1314.750	1310.805	1317.281	1314.279
Pendiente de la recta m=	0.65783	Coefficiente de correlación r=	1.0000	
Ordenada al origen b=	-1.38304	Coefficiente de determinación r²=	1.0000	
$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$ $S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}$ $S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X - \bar{X})^2}}$				
<p>S_{Y/X}= 1.4135 Sb= 0.0006 Sa= 0.3915</p> <p>Y_B= b</p>				
LD y LC en unidades de absorbancia.				
Y_{LD}= Y_B+ 3S_{Y/X}		Y_{LD}= 2.857		
Y_{LC}= Y_B+ 10S_{Y/X}		Y_{LC}= 12.752		
LD y LC en unidades de concentración.				
X_{LD}= Y_{LD} - b / m		X_{LD}= 6.45 µg/L		
X_{LC}= Y_{LC} - b / m		X_{LC}= 21.49 µg/L		



Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato				
Curva de calibración. Datos experimentales				
Estándar mg/L	Alturas (Y)			Promedio ABS
50	6.217	6.391	6.315	6.308
100	13.931	13.940	13.842	13.904
500	70.249	70.406	67.531	69.394
1000	139.757	140.776	139.939	140.157
2000	283.621	282.745	284.174	283.513
Pendiente de la recta m=	0.14199	Coefficiente de correlación r=	1.0000	
Ordenada al origen b=	-0.99833	Coefficiente de determinación r²=	1.0000	
$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$ $S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}$ $S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X - \bar{X})^2}}$				
<p>S_{Y/X}= 0.6852 S_b= 0.0003 S_a= 0.3915</p> <p style="text-align: center;">Y_B= b</p>				
LD y LC en unidades de absorbancia.				
Y_{LD}= Y_B+ 3S_{Y/X}			Y_{LD}= 1.057	
Y_{LC}= Y_B+ 10S_{Y/X}			Y_{LC}= 5.854	
LD y LC en unidades de concentración.				
X_{LD}= Y_{LD} - b / m			X_{LD}= 14.48 µg/L	
X_{LC}= Y_{LC} - b / m			X_{LC}= 48.26 µg/L	



Λ7-Sitostenil ferulato + β-Sitosteril ferulato				
Curva de calibración. Datos experimentales				
Estándar mg/L	Alturas (Y)			Promedio ABS
50	3.037	3.001	2.945	2.994
100	6.608	6.627	6.645	6.627
500	33.485	33.492	32.635	33.204
1000	66.600	67.101	66.683	66.795
2000	136.334	135.881	136.502	136.239
Pendiente de la recta m=	0.06821	Coefficiente de correlación r=	1.0000	
Ordenada al origen b=	-0.62190	Coefficiente de determinación r²=	0.9999	
$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$ $S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}$ $S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X - \bar{X})^2}}$				
<p>S_{Y/X}= 0.5307 Sb= 0.0002 Sa= 0.3915</p> <p style="text-align: center;">Y_B= b</p>				
LD y LC en unidades de absorbancia.				
Y_{LD}= Y_B+ 3S_{Y/X}			Y_{LD}= 0.970	
Y_{LC}= Y_B+ 10S_{Y/X}			Y_{LC}= 4.685	
LD y LC en unidades de concentración.				
X_{LD}= Y_{LD} - b / m			X_{LD}= 23.34 μg/L	
X_{LC}= Y_{LC} - b / m			X_{LC}= 77.81 μg/L	



Recuperación y sesgo a diferentes niveles de concentración

Nivel inferior de la curva

Cicloartenil ferulato							
CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO							
Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 50 mg/L + A11-RBDW							
REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L			% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		47.69			95	2.3	
2		48.11			96	1.8	
3		47.59			95	2.4	
4		48.23			96	1.7	
5		47.98			96	2.0	
6		51.44			103	-1.4	
7		50.42			101	-0.4	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO		
97.56	3.0299	3.1		7	85	A	115

24-Metileno cicloartenil ferulato							
CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO							
Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 50 mg/L + A11-RBDW							
REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L			% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		43.62			87	6.3	
2		43.84			88	6.1	
3		43.53			87	6.4	
4		44.09			88	5.9	
5		44.20			88	5.8	
6		44.85			90	5.1	
7		44.16			88	5.8	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO		
88.08	0.8831	1.0		7	85	A	115



Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 50 mg/L + A11-RBDW

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		85.93		172	-35.9	
2		85.52		171	-35.5	
3		80.63		161	-30.6	
4		90.02		180	-40.0	
5		93.20		186	-43.2	
6		93.58		187	-43.5	
7		90.33		181	-40.3	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
176.92	9.3390	5.3		7	85	A 115

Λ7-Sitostenil ferulato + β-Sitosteril ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 50 mg/L + A11-RBDW

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		58.45		117	-8.4	
2		58.62		117	-8.6	
3		56.98		114	-6.9	
4		58.00		116	-7.9	
5		57.07		114	-7.0	
6		68.17		136	-18.8	
7		66.32		133	-16.3	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
121.03	9.3419	7.7		7	85	A 115



Nivel medio de la curva

Cicloartenil ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 500 mg/L + A11-RBDW

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		482.00		96	18.0	
2		473.66		95	26.3	
3		483.04		97	16.9	
4		487.78		98	12.2	
5		487.74		98	12.2	
6		501.60		100	-1.5	
7		505.00		101	-4.9	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
97.74	2.2162	2.3		7	85	A 115

24-Metileno cicloartenil ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 500 mg/L + A11-RBDW

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		449.44		90	50.5	
2		441.07		88	58.9	
3		449.58		90	50.4	
4		453.45		91	46.5	
5		452.97		91	47.0	
6		465.60		93	34.3	
7		468.14		94	31.8	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
90.86	1.9019	2.1		7	85	A 115



Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **500 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		445.24		89	54.7	
2		425.38		85	74.6	
3		440.47		88	59.5	
4		446.08		89	53.9	
5		441.82		88	58.1	
6		466.39		93	33.6	
7		469.30		94	30.7	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
89.56	3.0654	3.4		7	85	A 115

Λ7-Sitostenil ferulato + β-Sitosteril ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **500 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		432.24		86	67.7	
2		418.77		84	81.2	
3		429.32		86	70.6	
4		431.58		86	68.4	
5		428.37		86	71.6	
6		443.76		89	56.2	
7		445.40		89	54.6	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
86.56	1.8428	2.1		7	85	A 115



Nivel superior de la curva

Cicloartenil ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **2000 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		1776.49		89	223.5	
2		1815.22		91	184.7	
3		1828.35		91	171.6	
4		1836.34		92	163.6	
5		1853.98		93	146.0	
6		1863.12		93	136.8	
7		1883.34		94	116.6	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
91.83	1.7424	1.9		7	85	A 115

24-Metileno cicloartenil ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **2000 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		1764.60		88	235.3	
2		1795.78		90	204.2	
3		1803.26		90	196.7	
4		1804.80		90	195.1	
5		1820.30		91	179.7	
6		1824.32		91	175.6	
7		1843.44		92	156.5	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
90.40	1.2481	1.4		7	85	A 115



Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **2000 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		1688.05		84	311.9	
2		1725.26		86	274.7	
3		1723.38		86	276.6	
4		1717.73		86	282.2	
5		1737.40		87	262.6	
6		1739.47		87	260.5	
7		1752.93		88	247.0	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
86.32	1.0311	1.2		7	85	A 115

Λ7-Sitostenil ferulato + β-Sitosteril ferulato

CANTIDAD RECUPERADA-% DE RECOBRO

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **2000 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA	DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L		% DE RECOBRO	SESGO mg/L	
1		1828.67		91	171.3	
2		1855.47		93	144.5	
3		1858.79		93	141.2	
4		1852.65		93	147.3	
5		1867.13		93	132.8	
6		1867.97		93	132.0	
7		1885.05		94	114.9	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %		N	INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL %DE RECOBRO	
92.97	0.8652	0.9		7	85	A 115



Precisión y Exactitud

Cicloartenil ferulato

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 2000 mg/L + A11-RBDW

REPLICA DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	REPLICA DIA 2	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	
1	1776.49	89	1	1707.30	85	
2	1815.22	91	2	1725.99	86	
3	1828.35	91	3	1730.43	87	
4	1836.34	92	4	1712.22	86	
5	1853.98	93	5	1735.37	87	
6	1863.12	93	6	1736.88	87	
7	1883.34	94	7	1723.39	86	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %	VS	PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %
92	1.7474	1.9		86	0.5615	0.6

En n=14 réplicas el % CV= 3.6

24-Metileno cicloartenil ferulato

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de 2000 mg/L + A11-RBDW

REPLICA DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	REPLICA DIA 2	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	
1	1764.60	88	1	1707.35	85	
2	1795.78	90	2	1726.98	86	
3	1803.26	90	3	1743.16	87	
4	1804.80	90	4	1723.15	86	
5	1820.30	91	5	1737.48	87	
6	1824.32	91	6	1748.86	87	
7	1843.44	92	7	1733.88	87	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %	VS	PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %
90	1.2481	1.4		87	0.6927	0.8

En n=14 réplicas el % CV= 2.5



Λ7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato

Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **2000 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	REPLICA DIA 2	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	
1	1688.05	84	1	1595.17	80	
2	1725.26	86	2	1620.35	81	
3	1723.38	86	3	1646.36	82	
4	1717.73	86	4	1611.04	81	
5	1737.40	87	5	1630.85	82	
6	1739.47	87	6	1645.73	82	
7	1752.93	88	7	1628.27	81	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %	VS	PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %
86	1.0310	1.2		81	0.9211	1.1
En n=14 réplicas él % CV= 3.3						

Λ7-Sitostenil ferulato + β-Sitosteril ferulato

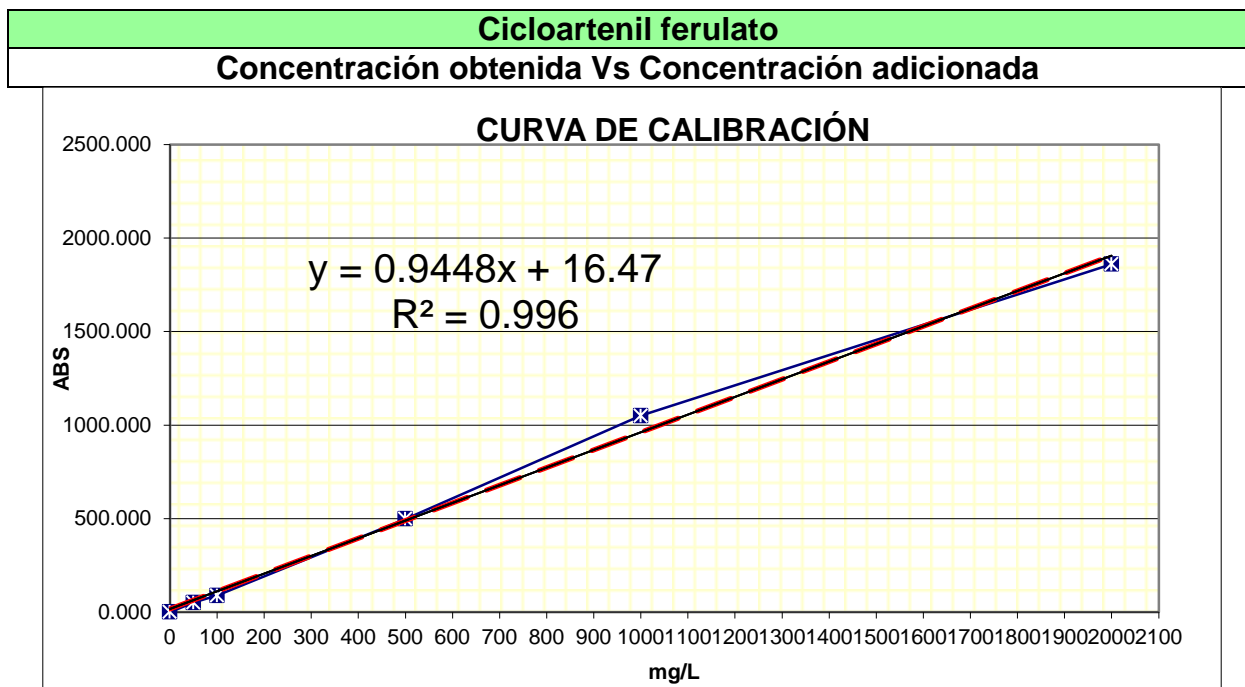
Estándar utilizado de Gamma-Oryzanol a concentración de **2000 mg/L + A11-RBDW**

REPLICA DIA1	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	REPLICA DIA 2	CANTIDAD RECUPERADA mg/L	% DE RECOBRO	
1	1828.67	91	1	1790.10	90	
2	1855.47	93	2	1813.60	91	
3	1858.79	93	3	1832.93	92	
4	1852.65	93	4	1799.94	90	
5	1867.13	93	5	1815.13	91	
6	1867.97	93	6	1829.60	91	
7	1885.05	94	7	1810.23	91	
PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %	VS	PROMEDIO %RECOBRO	DESVIACION ESTANDAR	COEF DE VARIACION EN %
93	0.8651	0.9		91	0.7582	0.8
En n=14 réplicas él % CV= 1.6						



Intervalo de trabajo

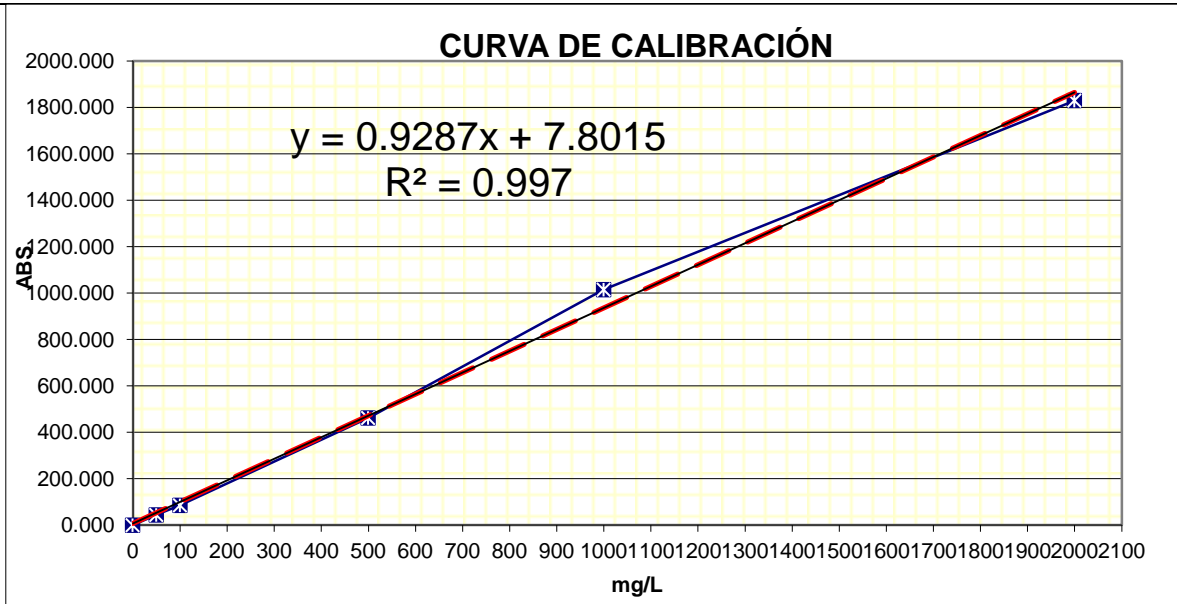
Cicloartenil ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
Blanco	0	0	0	0		
50	49.948	47.983	51.440	50.422	m =	0.9448
100	88.290	88.077	87.848	88.946	b =	16.4702
500	498.112	487.741	501.598	504.997	r =	0.9980
1000	1050.314	1035.798	1058.068	1057.075	r ² =	0.9960
2000	1860.814	1835.984	1863.119	1883.340		





24-Metileno cicloartenil ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
		0	0	0		
Blanco	0	0	0	0		
50	44.402	44.198	44.848	44.161	$m =$	0.9287
100	85.446	85.214	85.154	85.970	$b =$	7.8015
500	462.238	452.974	465.605	468.135	$r =$	0.9985
1000	1015.022	1006.084	1022.138	1016.843	$r^2 =$	0.9970
2000	1829.353	1820.299	1824.322	1843.437		

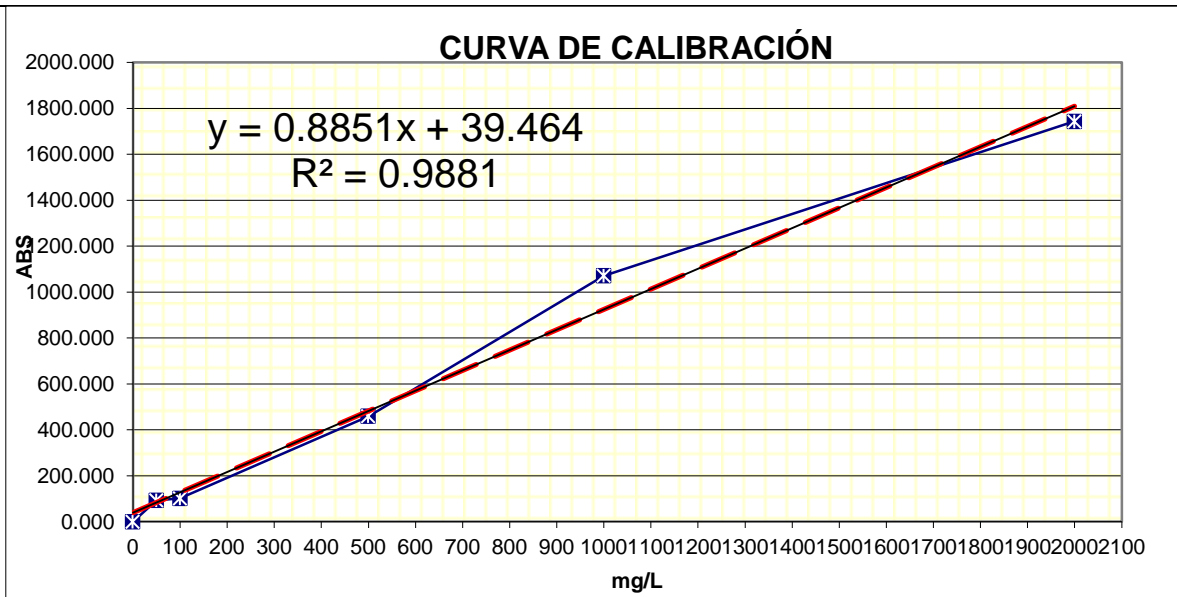
24-Metileno cicloartenil ferulato
Concentración obtenida Vs Concentración adicionada





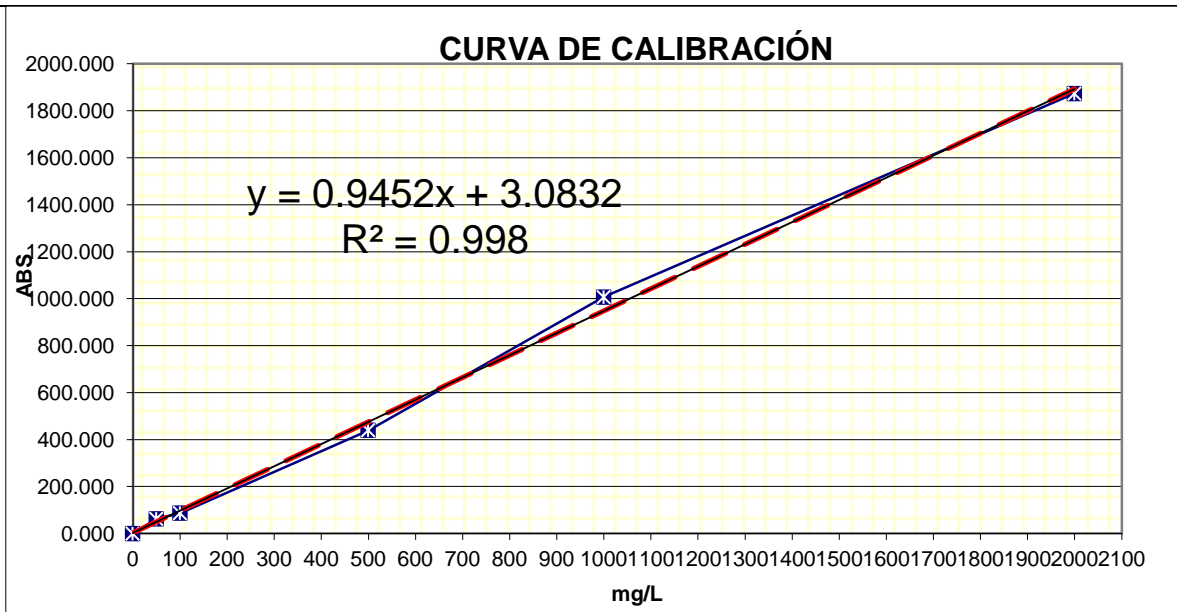
A7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
		0	0	0		
Blanco	0	0	0	0		
50	92.368	93.200	93.576	90.328	$m =$	0.8851
100	101.674	95.286	107.057	102.680	$b =$	39.4630
500	459.171	441.821	466.390	469.302	$r =$	0.9940
1000	1070.782	1062.738	1082.436	1067.173	$r^2 =$	0.9881
2000	1743.264	1737.396	1739.467	1752.930		

A7-Campestenil ferulato + Campesteril ferulato
Concentración obtenida Vs Concentración adicionada



A7-Sitostenil ferulato + β -Sitosteril ferulato						
Estándar (ppm) + A11-RBDW	Promedio ABS	Alturas (mAU)			Parámetros que determinan linealidad	
		0	0	0		
Blanco	0	0	0	0		
50	65.520	57.066	68.169	62.324	$m =$	0.9452
100	86.201	85.821	85.327	87.456	$b =$	3.0832
500	439.176	428.366	443.763	445.399	$r =$	0.9990
1000	1007.039	1004.966	1013.527	1002.624	$r^2 =$	0.9980
2000	1873.381	1864.127	1867.967	1885.050		

A7-Sitostenil ferulato + β -Sitosteril ferulato
Concentración obtenida Vs Concentración adicionada





4.2. Discusión de resultados

La validación se basa en guías técnicas emitidas por CONACYT y la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC), con el fin de definir la valoración de los criterios mínimos para llevar a cabo actividades de validación de métodos no normalizados o desarrollados que involucren mediciones físicas cuantitativas y cualitativas, para confirmar que estos se pueden aplicar correctamente.

La especificidad se llevó a cabo con gamma-Oryzanol extraído de aceite de arroz refinado y con estándar de gamma-Oryzanol en Isopropanol: Acetonitrilo (7:3 v/v), para verificar las posibles interferencias. El valor espectral del detector para la determinación de los componentes del gamma-Oryzanol es de 325nm, con los datos obtenidos se valoran los siguientes criterios.

A partir del estándar externo de gamma-Oryzanol 100% tech mix se preparó una solución madre de 26,250 ppm de la cual proviene la curva de calibración o soluciones de trabajo ver anexo B, para llevarse a cabo la valoración del sistema HPLC y del método de análisis propuesto, por medio de parámetros de validación oficiales.

Linealidad del sistema y del método

Para estudio de linealidad del sistema se realizaron inyecciones por triplicado de 5 niveles de concentración para graficar concentración Vs respuesta analítica, para confirmar visualmente la existencia de linealidad de los intervalos de curva de calibración. Para el estudio de linealidad del método se hicieron inyección por triplicado de muestras de aceite de arroz refinado fortificadas con los intervalos de la curva de calibración para valorar la linealidad visual y estadística del procedimiento de análisis propuesto. Los criterios de aceptación es el siguiente:

Criterios de aceptación.

Para determinar si el sistema y el método es lineal comparar el valor de r obtenido contra el indicado en el método de referencia si es el caso. Para métodos donde no se especifique un criterio se debe cumplir el siguiente: r (coeficiente de correlación) debe de ser mayor o igual a 0.99 y r^2 (coeficiente de determinación) debe de ser mayor o igual a 0.98. Cualquier otro criterio debe ser justificado y autorizado por el comité de validación del departamento de aseguramiento de calidad.



La linealidad del sistema y del método cumple con este criterio de aceptación para estos parámetros por el cual se procede a valorar los siguientes parámetros de validación.

Límite de Detección (LC) y Límite Cuantificación (LC)

Para valorar estos dos parámetros se utilizaron los datos obtenidos en la estimación del intervalo lineal o linealidad del sistema, los cuales se llevaron a tratamiento estadístico utilizando las ecuaciones propuestas en la guías de validación de métodos analíticos para cumplir los siguientes criterios de aceptación:

Criterios de aceptación.
1.- El Límite de Cuantificación del método debe de ser mayor al Límite de Detección del método.
2.- Iniciar las curvas de calibración, considerando el valor del límite de cuantificación como el primer punto de la curva.

Los límites de detección y cuantificación arrojados del tratamiento estadístico cumplen en la valoración de los componentes del Gamma-Oryzanol, al igual que son límites aceptables para el propósito del método en la valoración de componentes minoritarios en muestra de aceite de arroz refinado.

Recobro y Sesgo

Se procedió a evaluar los porcentajes de recobro y sesgo en 3 diferentes niveles de concentración (inferior, medio y superior) de la curva de calibración, para reportar la recuperación como intervalo en % y el sesgo en unidades establecidas por el método. El intervalo para evaluar el porcentaje de recobro se toma de la uniformidad de contenido según las guías técnicas de validación. El criterio es el siguiente:



Criterios de aceptación.	Resultados de la prueba
El promedio del porcentaje de recobro deberá de estar en un intervalo de 85 a 115%	Pasa / No pasa

Los resultados en los datos obtenidos marcan que la prueba pasa en la mayoría de los componentes y niveles de concentración, reflejando también cual es la concentración ideal para llevar a cabo valoración óptimas de precisión y exactitud del método propuesto.

Precisión y Exactitud

Se determina Reproducibilidad entre días y Repetibilidad entre replicas con los datos obtenidos del porcentaje de recobro de las inyecciones realizadas, los resultados están expresados en términos de coeficientes de variación (% CV) y desviación estándar máximos obtenidos para determinar si se cumple el siguiente criterio de aceptación:

Criterios de aceptación.
La repetitividad y reproducibilidad para contenido en alimentos a concentración del analito (0.1-1%) es de $CV_r \leq 3\%$ y $CV_R \leq 6\%$

La Reproducibilidad entre días y Repetitividad entre replicas están dentro de los parámetros de aceptación propuesto por las guías técnicas de validación para método analíticos adecuados a su propósito.

Intervalo de trabajo

Con los datos obtenidos de la valoración de la linealidad del método, se procedió a evaluar la concentración obtenida vs la concentración adicionada en unidades establecidas por el método, al igual que la valoración grafica

Criterios de aceptación.
Para determinar si el intervalo de trabajo cumple, comparar el valor obtenido de r^2 (coeficiente de determinación) el cual debe de ser mayor o igual a 0.95. Cualquier otro criterio debe ser justificado y autorizado por el comité de validación del departamento de aseguramiento de calidad.



Los resultados tanto gráficamente y estadísticamente cumple con este criterio de aceptación para el intervalo de trabajo propuesto para este método.

5. CONCLUSION

A partir de los resultados obtenidos en el transcurso de la presente validación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- El sistema HPLC en conjunto con el sistema de detección cuenta con linealidad para llevarse a cabo protocolos de validación.
- La evaluación del desempeño inicial del método analítico propuesto (validación instrumental) permitió validarlo satisfactoriamente, ya que se determinaron para cada uno de los componentes principales del gamma-Oryzanol su rango de trabajo, su límite de detección y cuantificación, su precisión, exactitud y linealidad dentro de los criterios de aceptación establecidos por guías técnicas de validación.
- La metodología aplicada resulto ser apropiada para determinar y cuantificar los ferulatos de fitoesteroles del gamma-Oryzanol, con límites de detección y cuantificación adecuados, presentando además una buena precisión y exactitud.
- Se cumple con los objetivos específicos al llevarse a cabo trabajos de validación en la evaluación de la metodología propuesta para la determinación y cuantificación de ferulatos de fitoesteroles en lípidos de salvado de arroz.
- Con la evaluación de esta metodología en el proceso de validación se verifico los parámetros de desempeño para su uso analítico.
- Es evidente que para mejorar los resultados obtenido en una revalidación es necesario contar un sistema de inyección automático, al igual que un segundo analista para valorar parámetros de reproducibilidad y repetibilidad, y con ello llevarse a cabo una validación más completa.
- Es inevitable que para la caracterización del desempeño del método no tengamos en cuenta que es un proceso costoso por consideraciones de tiempo y costo de insumos.



6. ANEXOS

6.1. Anexo A- Glosario

Analito: Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

Blanco de muestra: Son matrices que no contienen el analito de interés (placebo). Son difíciles de obtener pero son necesarios para estimar las interferencias que pudieran encontrarse durante el análisis de las muestras de prueba.

Matriz o Placebo: Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Calidad: La totalidad de propiedad y características de un producto o servicio que se refiere a su capacidad para satisfacer necesidades declaradas o implícitas.

Aseguramiento de la calidad: Todas aquellas actividades planeadas y sistemáticas implementadas dentro del sistema de calidad y demostradas como necesarias para proporcionar una confianza adecuada de que una entidad cumplirá sus requisitos de calidad.

Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Protocolo de validación: Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistentes.

Validación de un método analítico: Es el proceso por el cual se establece, por medio de estudio de laboratorio, que las características de desempeño del método reúnen los requisitos para las aplicaciones analíticas concebidas. Las características de desempeño se expresan en función de los parámetros analíticos que serán descritos más adelante.

Adecuación al propósito: Grado al cual los datos producidos por un proceso de medición permiten a un usuario tomar decisiones técnicas y administrativas correctas para un propósito establecido.

Control de calidad interno: Serie de procedimientos asumidos por el personal de un laboratorio para el continuo seguimiento de las operaciones y de los resultados de las mediciones con el fin de decidir si los resultados son lo suficientemente confiables como para ser emitidos.



Criterios de aceptación: Parámetros bajo los cuales el resultado de una prueba será considerado aceptable.

Curva de calibración: Es la representación gráfica de la señal medida como una función de cantidad de analito.

Medición: Conjunto de operaciones que tienen por objeto determinar un valor de una magnitud.

Exactitud de una medición: es la proximidad de concordancia entre los resultados de una medición y el valor de referencia aceptado.

Material de referencia: Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos como para ser utilizados en la calibración de aparatos, en la evaluación de un método de medición o para asignar valores a otros materiales.

Especificidad: Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no otros componentes de la muestra.

Límite de detección: El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable o la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Límite de cuantificación: La menor concentración de un analito que puede determinarse con la precisión y una exactitud aceptable bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Intervalo lineal: Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

Intervalo de trabajo: Intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyendo dichas concentraciones) y para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad.

Muestra adicionada o fortificada: Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito de interés.

Parámetros de desempeño: Parámetros específicos a evaluar en una validación.

Recuperación o recobro: Cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando esta es conducida a través del método analítico



completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje.

Repetibilidad: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.

Reproducibilidad (precisión intermedia): Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días.

Respuesta analítica: Lectura obtenida al aplicar un método analítico, como pueden ser el área o altura del pico en un cromatograma, lectura de absorbancia, cuenta de iones en un espectro de masas, lectura en mV, mL gastados en volumetría, diferencia de peso en un gravímetro, entre otros.

Robustez: Es la medida de la capacidad del método analítico de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones (efecto de cambio en las condiciones) en los parámetros del mismo, proporcionando un índice de su confiabilidad durante su uso normal.

Sensibilidad: Es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Es la pendiente del intervalo de trabajo y cuanto mayor es esta, mayor es la sensibilidad del método.

Sesgo: Es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido.



6.2. Anexo B – Preparación de la curva de calibración

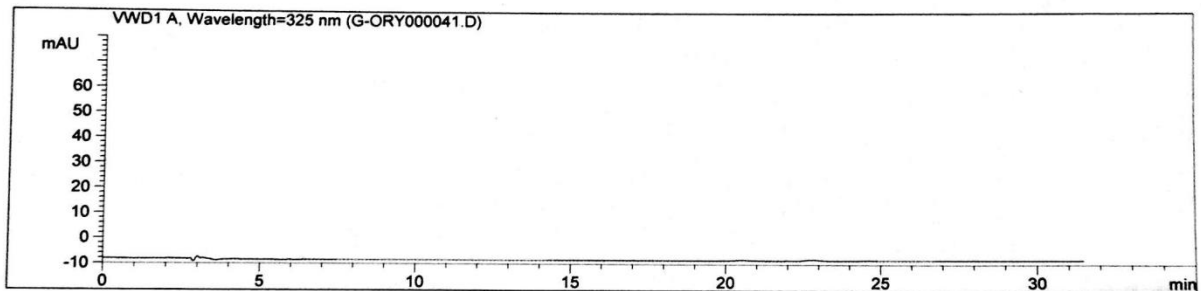
PREPARACION DE ESTANDARES PARA CURVA DE CALIBRACION							
							Folio: 010
I.- INFORMACION RELATIVA AL ESTANDAR							
NOMBRE: Gamma-Oxazol				FECHA DE PREPARACION: 02/03/13			
No. DE LOTE: 73457				FECHA DE CADUCIDAD:			
PUREZA: 100% TECH MIX				FECHA DE EMISION DEL CERTIFICADO: ENERO 2013			
MATRIZ: 2 propanol : ACN 70:30 v/v				UNIDADES: ppm			
II.- INFORMACION RELATIVA AL MATERIAL VOLUMETRICO							
ID MATRAZ	MA2-151	CAPACIDAD	2ml	ml	N/A	VERIFICACION INTERNA	
ID MATRAZ	MA2-152		2ml		N/A	VERIFICACION INTERNA	
ID MATRAZ	MA10-94		9.972 mL		✓	VERIFICACION INTERNA	
ID MATRAZ							
ID MATRAZ							
III.- PREPARACION DE SOLUCION DE TRABAJO							
FECHA:		02/03/13			HORA:		09:00 am
ANALITO: Gamma-Oxazol							
C1=	26,250	ppm			C1=	26,250	ppm
V1=	0.38	mL			V1=	0.76	mL
C2=	1000	ppm			C2=	2000	ppm
V2=	9.972	mL			V2=	9.972	mL
C1=	26,250	ppm			C1=	26,250	ppm
V1=	0.19	mL			V1=	0.04	mL
C2=	500	ppm			C2=	100	ppm
V2=	9.972	mL			V2=	9.972	mL
C1=	26,250	ppm			C1=	26,250	ppm
V1=	0.02	mL			V1=	0.33	mL
C2=	50	ppm			C2=	4331	ppm
V2=	9.972	mL			V2=	2	mL
ID MICROPIPETA: MPO1 - MPO2		ID SOLVENTE: 006-02/003-08		SOLVENTE: 2 propanol : ACN			
PREPARADO POR:		SUPERVISO:		FECHA DE PREPARACION:			
Rafael Clemente		Isidro Guémez P.		02/03/13			



6.3. Anexo C – Cromatogramas

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000041.D
Sample Name: BLANCO DE SOLVENTE

```
=====
Acq. Operator   : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2                Location : Vial 0
Injection Date  : 11/03/2013 11:26:25 a.m.
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 11/03/2013 11:25:59 a.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 11/03/2013 01:13:04 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
                  (modified after loading)
Sample Info     : FO-ASC-032-REV-3
                  CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO MUESTRA
                  LOTE: 70:30 V/V
                  OBSERVACIONES: ISOPROPANOL: ACETONITRILO
                  FOLIO: MAR-2013
=====
```



```
=====
Area Percent Report
=====
```

```
Sorted By      : Signal
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

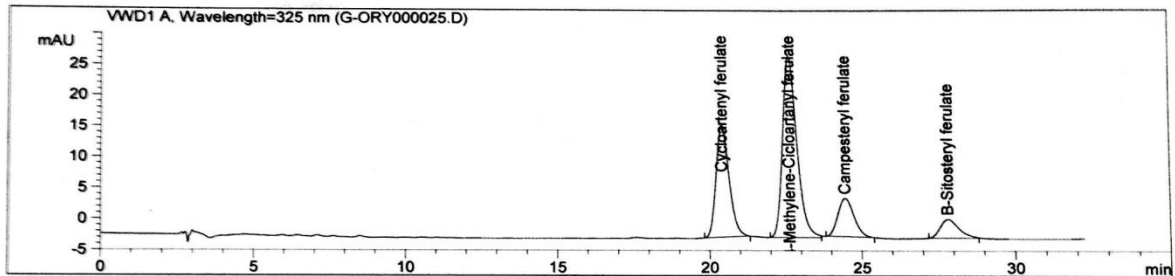
No peaks found

```
=====
*** End of Report ***
=====
```




Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000025.D
Sample Name: Curva de Calibracion

=====
Acq. Operator : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2 Location : Vial 0
Injection Date : 03/03/2013 08:48:44 a.m.
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed : 03/03/2013 08:14:58 a.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed : 03/03/2013 09:54:42 a.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
(modified after loading)
Sample Info : FO-ASC-032-REV-3
CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO ESTANDAR
LOTE: 50 ppm
OBSERVACIONES: G-ORYZANOL
FOLIO:



=====
Height Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 03/03/2013 09:53:36 a.m.
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=325 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	20.387	BB	0.4531	18.19695	31.9394	Cycloartenyl ferulate
2	22.613	BBA	0.4969	29.52275	51.8184	24-Methylene-Cicloartanyl ferulate
3	24.440	BB	0.5666	6.21720	10.9125	Campesteryl ferulate
4	27.802	BBA	0.6020	3.03655	5.3298	B-Sitosteril ferulate

Totals : 56.97344 100.0000

4 Warnings or Errors :

Warning : Invalid calibration curve, (Cycloartenyl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (24-Methylene-Cicloartanyl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (Campesteryl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (B-Sitosteril ferulate)

Instrument 2 03/03/2013 09:55:51 a.m. RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA

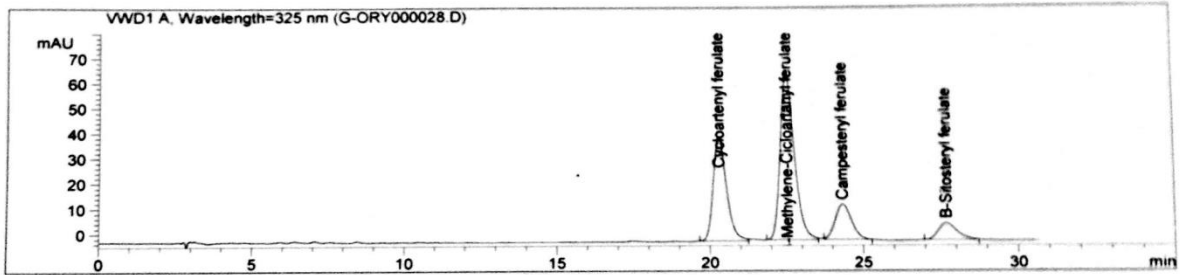
Page 1 of 2



Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000028.D
 Sample Name: Curva de Calibracion

```

=====
Acq. Operator   : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2                      Location : Vial 0
Injection Date  : 03/03/2013 10:30:17 a.m.
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 03/03/2013 10:30:09 a.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 03/03/2013 01:00:45 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
                  (modified after loading)
Sample Info     : FO-ASC-032-REV-3
                  CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO ESTANDAR
                  LOTE: 100 ppm
                  OBSERVACIONES: G-ORYZANOL
                  FOLIO:
=====
  
```



=====
 Height Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 03/03/2013 09:53:36 a.m.
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=325 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	20.295	BBA	0.4577	41.07276	32.2246	Cycloartenyl ferulate
2	22.518	BBA	0.4915	65.84569	51.6608	24-Methylene-Cicloartanyl ferulate
3	24.323	BBA	0.5780	13.93093	10.9299	Campesteryl ferulate
4	27.681	BBA	0.6457	6.60825	5.1847	B-Sitosteryl ferulate

Totals : 127.45762 100.0000

4 Warnings or Errors :

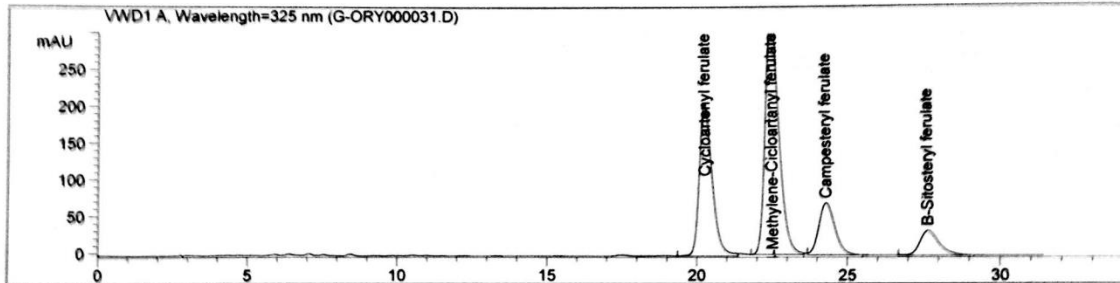
- Warning : Invalid calibration curve, (Cycloartenyl ferulate)
- Warning : Invalid calibration curve, (24-Methylene-Cicloartanyl ferulate)
- Warning : Invalid calibration curve, (Campesteryl ferulate)
- Warning : Invalid calibration curve, (B-Sitosteryl ferulate)



Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000031.D
 Sample Name: Curva de Calibracion

```

=====
Acq. Operator   : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2                Location : Vial 0
Injection Date  : 03/03/2013 12:06:24 p.m.
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 03/03/2013 12:05:30 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 03/03/2013 01:32:39 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
                  (modified after loading)
Sample Info     : FO-ASC-032-REV-3
                  CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO ESTANDAR
                  LOTE: 500 ppm
                  OBSERVACIONES: G-ORYZANOL
                  FOLIO:
=====
  
```



=====
 Height Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 03/03/2013 09:53:36 a.m.
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=325 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	20.297	BBA	0.4506	205.95985	32.1977	Cycloartenyl ferulate
2	22.526	BBA	0.4766	329.97849	51.5856	24-Methylene-Cicloartanyl ferulate
3	24.316	BBA	0.5709	70.24894	10.9820	Campesteryl ferulate
4	27.665	BBA	0.6586	33.48498	5.2347	B-Sitosteryl ferulate

Totals : 639.67226 100.0000

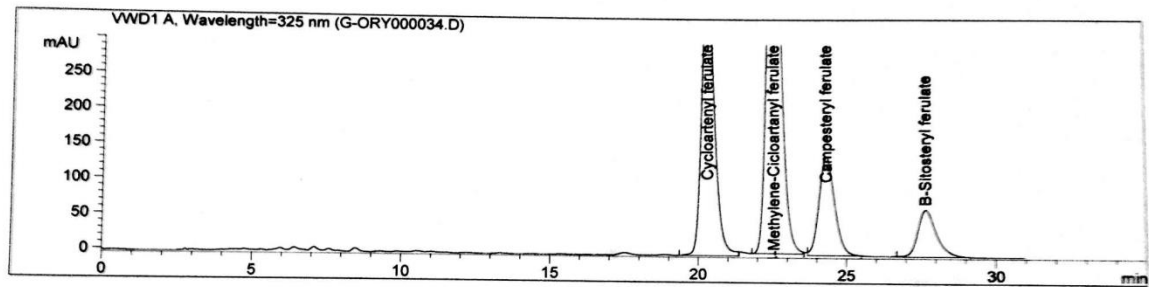
4 Warnings or Errors :

- Warning : Invalid calibration curve, (Cycloartenyl ferulate)
- Warning : Invalid calibration curve, (24-Methylene-Cicloartanyl ferulate)
- Warning : Invalid calibration curve, (Campesteryl ferulate)
- Warning : Invalid calibration curve, (B-Sitosteryl ferulate)



Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000034.D
Sample Name: Curva de Calibracion

=====
Acq. Operator : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2 Location : Vial 0
Injection Date : 03/03/2013 01:42:47 p.m.
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed : 03/03/2013 01:42:01 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed : 03/03/2013 01:32:39 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
(modified after loading)
Sample Info : FO-ASC-032-REV-3
CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO ESTANDAR
LOTE: 1000 ppm
OBSERVACIONES: G-ORYZANOL
FOLIO:
=====



=====
Height Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 03/03/2013 09:53:36 a.m.
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=325 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	20.312	BBA	0.4443	408.47879	32.1903	Cycloartenyl ferulate
2	22.553	BBA	0.4685	654.11444	51.5477	24-Methylene-Cicloartanyl ferulate
3	24.326	BBA	0.5641	139.75682	11.0136	Campesteryl ferulate
4	27.667	BBA	0.6497	66.59995	5.2484	B-Sitosteryl ferulate

Totals : 1268.95000 100.0000

4 Warnings or Errors :

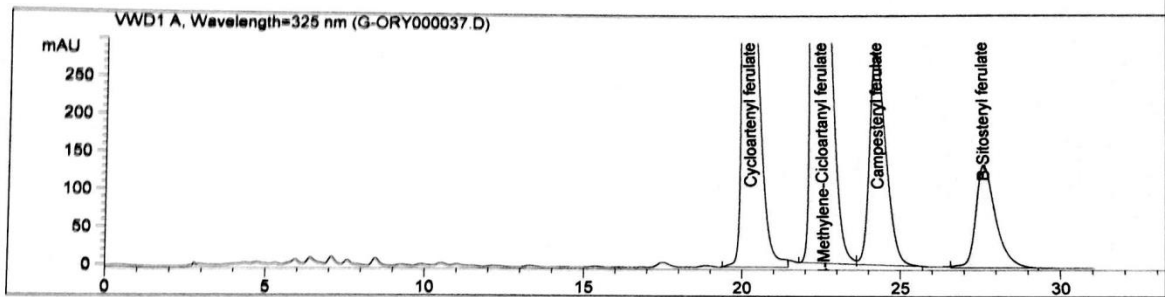
Warning : Invalid calibration curve, (Cycloartenyl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (24-Methylene-Cicloartanyl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (Campesteryl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (B-Sitosteryl ferulate)



Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000037.D
 Sample Name: Curva de Calibracion

```

=====
Acq. Operator   : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2                Location : Vial 0
Injection Date  : 03/03/2013 03:17:55 p.m.
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 03/03/2013 03:17:40 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 03/03/2013 03:57:52 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
                  (modified after loading)
Sample Info     : FO-ASC-032-REV-3
                  CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO ESTANDAR
                  LOTE: 2000 ppm
                  OBSERVACIONES: G-ORYZANOL
                  FOLIO:
=====
  
```



=====
 Height Percent Report
 =====

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 03/03/2013 03:56:15 p.m.
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=325 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	20.324	BBA	0.4414	822.82306	32.1726	Cycloartenyl ferulate
2	22.594	BV	0.4637	1314.75012	51.4071	24-Methylene-Cicloartanyl ferulate
3	24.346	VBA	0.5536	283.62054	11.0896	Campesteryl ferulate
4	27.674	BBA	0.6469	136.33371	5.3307	B-Sitosteryl ferulate

Totals : 2557.52744 100.0000

4 Warnings or Errors :

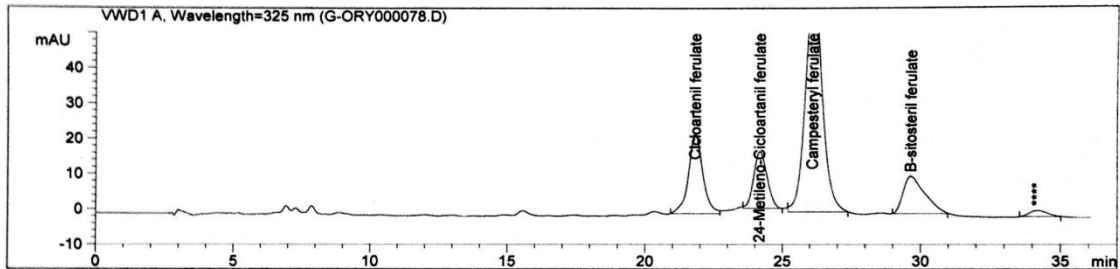
```

Warning : Invalid calibration curve, (Cycloartenyl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (24-Methylene-Cicloartanyl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (Campesteryl ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (B-Sitosteryl ferulate)
  
```



Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000078.D
Sample Name: A11-RBDW

=====
Acq. Operator : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2 Location : Vial 0
Injection Date : 14/03/2013 08:53:14 a.m.
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed : 03/03/2013 08:14:58 a.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed : 14/03/2013 11:03:20 a.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
(modified after loading)
Sample Info : FO-ASC-032-REV-3
CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO MUESTRA
LOTE: A11-RBDW
OBSERVACIONES: THAI EDIBLE
FOLIO: MAR-2013



=====
Height Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 14/03/2013 10:58:09 a.m.
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=325 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	21.804	BBA	0.5384	22.44930	19.5786	Cicloartenil ferulate
2	24.159	BBA	0.5250	15.96901	13.9270	24-Metileno-Cicloartani ferulate
3	26.081	BBA	0.6483	63.98420	55.8022	Campesteril ferulate
4	29.628	BBA	0.7707	10.50594	9.1625	B-sitosteril ferulate
5	34.174	BBA	0.5500	1.75400	1.5297	****

Totals : 114.66245 100.0000

5 Warnings or Errors :

Warning : Invalid calibration curve, (Cicloartenil ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (24-Metileno-Cicloartani ferulate)
Warning : Invalid calibration curve, (Campesteril ferulate)

Instrument 2 14/03/2013 11:03:31 a.m. RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA

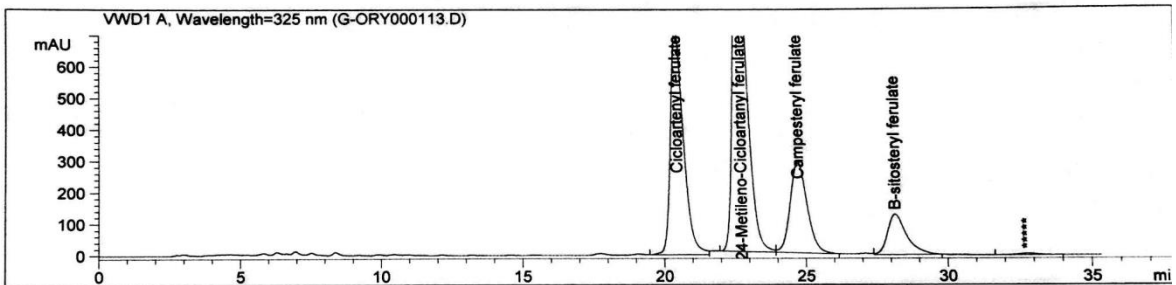
Page 1 of 2



Data File C:\HPCHEM\2\DATA\G-ORY000113.D
 Sample Name: A11-RBDW + STD 2000 ppm

```

=====
Acq. Operator   : RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Acq. Instrument : Instrument 2                Location : Vial 0
Injection Date  : 19/03/2013 08:59:11 a.m.
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 03/03/2013 08:14:58 a.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\G-ORYZANOL.M
Last changed    : 19/03/2013 01:21:02 p.m. by RAFAEL CLEMENTE DE LA ROSA
                  (modified after loading)
Sample Info     : FO-ASC-032-REV-3
                  CONTROL DE CALIDAD: PRODUCTO MUESTRA + STD
                  LOTE: A11-RBDW + 2000 ppm DE STD
                  OBSERVACIONES: STD DE G-ORYZANOL
                  FOLIO: MAR-2013
=====
  
```



Height Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Tuesday, 19 19e March 19e 2013 01:20:03 p.m.
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=325 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	20.469	BBA	0.4806	723.95435	31.7055	Cicloartenyl ferulate
2	22.725	BV	0.5025	1138.42505	49.8572	24-Metileno-Cicloartenyl ferulate
3	24.750	VBA	0.6414	288.98511	12.6561	Campesteryl ferulate
4	28.158	BBA	0.6912	127.57311	5.5871	B-sitosteryl ferulate
5	32.797	BBA	0.7270	4.43336	0.1942	*****

Totals : 2283.37098 100.0000

5 Warnings or Errors :

Warning : Invalid calibration curve, (Cicloartenyl ferulate)
 Warning : Invalid calibration curve, (24-Metileno-Cicloartenyl ferulate)
 Warning : Invalid calibration curve, (Campesteryl ferulate)



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asociación Española de Farmacéuticos de la industria A.E.F.I. 2001. Validación de métodos analíticos. Barcelona, España.
2. Block G. y Langseth L. 1994. *Antioxidant vitamins and disease prevention*. Food Technol. 48, 80-84.
3. Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura. 2011. CCAYAC-P-058. *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. Revisado el 9 de enero de 2014 de http://www.cofepris.gob.mx/Tramites%20y%20Servicios/Terceros%20Autorizados/GTAnov09_archivos_/cvfq032011.pdf
4. Montgomery, D.C., y Runger G.C. 1996. *Probabilidad y Estadística Aplicadas a la Ingeniería*. México, D.F. McGraw-Hill.
5. Engel, K.H., Miller, A., Frezel T. y Schmar, R. 2003. *Coupled liquid chromatography-gas chromatography for the rapid analysis of γ -oryzanol in rice lipids*. J. Chromatogr A. 985, 403-410.
6. Fang N., Yu S. y Badger T.M. 2003. *Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS*. J Agri Food Chem. 51, 3260-3267.
7. Food and Drug Administration. Center for Drugs and Biologics 1987. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Method Validation, Revisado el 9 de enero de 2014 de <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm123124.htm>
8. Flores Franco, Anabelly Carolina. 2002. *Guía para validar métodos analíticos nuevos o modificados para productos farmacéuticos*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Tesis de Licenciatura.
9. Gunstone, F. D. 2011. *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*. West Sussex, UK. Wiley- Blackwell.
10. Gong-Yuansheng, Y y Yao-Huiyuan, H. 2001. Purification and identification of gamma-oryzanol from rice bran. J Chin Cer Oils Assoc. 16, 30-34.
11. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos *Guía de validación de métodos analíticos*. México, D.F. 2002.
12. Gliszczynska-Swiglo, A. y Sikorska, E. 2004. *Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils*. J Chromatogr A. 1048, 195-198.
13. McNair, H.M. y Esquivel, H.B. 1980. *Cromatografía Líquida de Alta Presión*. Nueva York. U.S.A. Editorial Nika.



14. International Organization for Standardization. 1994. ISO 5725-2:1994. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.*
15. Kim JS, Godber JS King J, Priyawiwatkul W. 2001. Inhibition of cholesterol autoxidation by the nonsaponifiable fraction in rice bran in an aqueous model system. *JAOCS* 78, 685-689.
16. Métodos analíticos adecuados a su propósito, 2 Edición de la Eurachem, Publicación técnica CNM-MRD-PT-030, CENAM.
17. Miller J. N. y Miller J. C. 2002. *Estadística y Quimiometria para Química Analítica.* España. Pearson Educación S.A.
18. Quattrocchi O., Abelaira de Andrizzi, S. y Laba E. 1992. *Introducción al HPLC: Aplicación y práctica.* Buenos Aires, Argentina. Editorial Universitaria.
19. Rodrigues CEC, Onoyama MM, Meirelles AJA. 2006. Optimization of the rice bran oil deacidification process by liquid-liquid extraction. *J. Food Eng.* 73 (4) 370-378.
20. Robert A. Moreau y Afaf Kamal-Eldin. *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils.* Publication AOCS press. 3a edition. Printed in the United States of America. 2009.
21. Skoog D.A. Holler F.J. y Nieman T.A. *Principios de Análisis Instrumental.* 2001. Barcelona, Barcelona, España. Mc Graw-Hill.
22. Tortosa E. Barber CB. 1979. El salvado de arroz y su potencial en alimentación animal. *Avances en alimentación y mejora animal.* Valencia 20 (5) 13-21.
23. LGC (Teddington) Ltd. 1998. *The Fitness for Purpose of Analytical methods: A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.* Eurachem.
24. The United States Pharmacopeial Convention. 2006. USP 29/NF 24/2006. *The Official Compendia of Standards.*
25. Wilson T.A., Nicolosia R.J., Woolfrey B. y Kritchevsky D. 2007. Rice bran oil and oryzanol reduced plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *J Nutr Biochem.* 18, 105-112.