

Validación de un método espectrofotométrico para la determinación del contenido de aldehídos en el aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®)

Oscar Ernesto Ledea Lozano, Maykel González Torres, Carlos Hernández Castro, Adaris López Marzo, Jesús Moleiro Mirabal y Arístides Rosado Pérez.

Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Código Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 29 de noviembre de 2004. Aceptado: 18 de julio de 2005.

Palabras clave: validación, método espectrofotométrico, aldehídos, aceite de girasol ozonizado OLEOZON®.
Key words: validation, spectrophotometric method, aldehydes, ozonized sunflower oil (OLEOZON®).

RESUMEN. El aceite de girasol ozonizado OLEOZON® presenta excelentes propiedades germicidas (bactericida, fungicida virucida y antiparasitario) que permiten su utilización en el tratamiento de enfermedades de origen infeccioso. En este trabajo se presenta la validación del método espectrofotométrico de determinación de los aldehídos presentes en el aceite de girasol ozonizado OLEOZON®, a través de la formación de sus derivados 2,4-dinitrofenilhidrazonas y la posterior medición de la absorbancia a 338 nm. La evaluación del método establecido se realizó mediante la determinación de los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad. En la evaluación de este método analítico se obtuvieron pruebas suficientes para demostrar que dicho método resulta lineal ($r = 0,999$ y $r^2 = 0,998$), preciso (repetibilidad CV = 0,38 %, precisión intermedia CV = 0,81 %) exacto (recobrado $\geq 97,8$ %) y sensible (límite de detección = $1,04 \cdot 10^{-9}$ mol/L y límite de cuantificación = $1,28 \cdot 10^{-9}$ mol/L) en el intervalo de concentraciones de aldehídos estudiado. Los diferentes compuestos presentes en el OLEOZON®, tales como: peróxidos, ácidos carboxílicos, ozónidos, y compuestos poliméricos no interfieren en la determinación del contenido de aldehídos por este método, por lo que es específico. Se realizó la determinación de la concentración de aldehídos referida al nonanal, en una muestra representativa de OLEOZON® que resultó de $(1,21 \pm 0,04)$ mmol/g.

ABSTRACT. Ozonized sunflower oil (OLEOZON®) has excellent germicidal properties (germicidal, fungicidal, virucidal, and antiparasitary) and it is very useful in the treatment of infectious diseases. The validation of a spectrophotometric method for the determination of aldehyde content in OLEOZON® is presented in this work. The method is based on the formation of 2,4-dinitrophenylhydrazones of aldehydes, followed by the measurement of the absorbance at 338 nm. The parameters of linearity, precision, accuracy, specificity, and sensitivity were evaluated. The method employed was linear ($r = 0,999$ y $r^2 = 0,998$), precise (repeatability CV = 0.38 %, intermediate precision CV = 0.81 %), exact (recovery ≥ 97.8 %) and sensitive (detection limit = $1.04 \cdot 10^{-9}$ mol/L and quantitation limit = $1.28 \cdot 10^{-9}$ mol/L) in the interval of aldehyde concentrations studied. The method employed was specific to aldehydes, because the different compounds, which are present in OLEOZON®, such as peroxides, carboxylic acids, ozonides and polymeric compounds, do not interfere in the aldehyde content determination by this method. The aldehyde content with regards to nonanal, in a representative sample of OLEOZON® was (1.21 ± 0.04) mmol/g.

INTRODUCCION

El OLEOZON® es un medicamento desarrollado en el Centro de Investigaciones del Ozono, a partir de la ozonización del aceite de girasol en condiciones adecuadas.¹ Es un producto germicida de amplio espectro, efectivo frente a bacterias, virus, hongos y parásitos por lo que puede emplearse en el tratamiento de diversos procesos sépticos locales, de infecciones dermatológicas, ginecológicas y en la parasitosis por *Giardia Lamblia*, entre otras.²⁻⁴

EL producto es un líquido oleoso, de color amarillo y de olor característico. En cuanto a su composición, se plantea que es una mezcla compleja y que puede explicarse considerando el mecanismo de Criegee para la ozonización de compuestos insaturados.^{5,6}

Entre los compuestos formados en el mecanismo de Criegee, en dependencia de las condiciones de reacción, se encuentran los aldehídos, los ácidos y las distintas especies peroxídicas (como ozónidos y peróxidos) que presentan un marcado poder germicida, de aquí que el medicamento sea útil en el tratamiento de afecciones de etiología infecciosa.⁷

Durante la ozonización de triglicéridos insaturados se producen dos tipos fundamentales de aldehídos, los de bajo peso molecular, con longitudes de cadena carbonada entre seis y nueve átomos de carbono y los de estructura triglicéridica o "core-aldehídos".^{8,9}

Se conoce la utilización de varios agentes derivatizantes para la determinación de los aldehídos. Entre aquellos que propician los mejores resultados, se encuentra la familia de derivados de las hidrazinas como son: la fenilhidrazina, la difenilhidrazina, la *p*-bromofenilhidrazina, *p*-nitrofenilhidrazina, *o*- y *p*-clorobenzohidrazinas, 3-nitrobenzohidrazina, nitroguanilhidrazina, y la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH). De todos ellos, esta última es la que ha mostrado una mayor aplicabilidad, ya que la reacción entre ella y los aldehídos es cuantitativa, de estequiometría conocida y específica a los compuestos carbonílicos. Igualmente, las 2,4-dinitrofenilhidrazonas son sólidos de gran estabilidad química, que presentan además elevados coeficientes de extinción molar, lo que permite el empleo con gran sensibilidad de la espectrofotometría UV-visible para su determinación.^{10,11}

Otros derivados utilizados en la determinación de aldehídos son: α - y β -naftilhidrazonas, *o*-, *m*-, y *p*-tosilsemicarbazonas, *p*-fenilsemicarbazona, 3,5-dinitrofenilsemicarbazona, benzotiazoles, benzotiazolinas y los productos de condensación con medona (dimedon).^{12, 13}

En estudios previos realizados al OLEOZON[®], Ledea y col. demostraron que los aldehídos hexanal y nonanal eran los compuestos mayoritarios de la fracción volátil de este medicamento, mientras que Mortimer y col., reportaron iguales coeficientes de extinción molar para las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de ambos aldehídos.^{14,15}

No obstante, en la literatura especializada, el único método descrito para la determinación de aldehídos en aceites vegetales ozonizados, es el establecido en el registro médico del OLEOZON[®], aunque posee las limitaciones reconocidas de los métodos volumétricos, además de una baja sensibilidad.⁵

Este trabajo tuvo como objetivos realizar la validación de una técnica espectrofotométrica para la determinación de los aldehídos presentes en el OLEOZON[®], mediante la formación de las correspondientes 2,4-dinitrofenilhidrazonas y determinar el contenido total de aldehídos en dicho medicamento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La 2,4-dinitrofenilhidrazina (Sigma, USA) pura para análisis se recristalizó dos veces en metanol antes de

utilizarse. Los disolventes empleados (etanol 96 %, metanol y *n*-hexano), el ácido sulfúrico y el nonanal (utilizado como sustancia de referencia) fueron de calidad puro para análisis (Merck, Darmstadt, Alemania).

El etanol (96 %) se trató con disoluciones de óxido de plomo y de hidróxido de potasio al 50 % (p/v), para eliminar posibles impurezas de compuestos carbonílicos (aldehídos o cetonas) y posteriormente, se destiló. Por otra parte, el *n*-hexano se ozonizó a temperatura ambiente y después se mezcló con una disolución compuesta por trifenilfosfina (7,5 mmol/L), 2,4-DNFH (20 mmol/L) y ácido sulfúrico (0,5 mol/L). La mezcla resultante se colocó a reflujo durante tres horas, se destiló y se guardó en un frasco ámbar.

Al aceite de girasol utilizado (Ideal, Argentina) se le eliminaron los aldehídos volátiles presentes por disolución en cloroformo (100 mL de aceite en un litro del disolvente) y posterior evaporación al vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.

El OLEOZON[®] se produjo en el Centro de Investigaciones del Ozono (Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba). Se conformó una muestra representativa con frascos de cinco lotes del medicamento que se mezclaron en uno ámbar de tapa esmerilada. Se homogenizó la muestra. Posteriormente, se rotuló el frasco como muestra representativa y se conservó en refrigeración (4 a 8 °C).

MÉTODOS

Preparación de la disolución de 2,4-dinitrofenilhidrazina

Se pesaron 0,75 g de 2,4-DNFH purificada en un volumétrico de 50 mL y se enrasó con una disolución de ácido sulfúrico en etanol al 10 %. El volumétrico se colocó en un baño ultrasónico (Sonorex, Bandelin electronic, Alemania) por el tiempo necesario para la disolución de todo el soluto. Se sacó del equipo de ultrasonido y se dejó reposar una hora. Se mantuvo la disolución en refrigeración hasta una hora antes del análisis.

Análisis por espectrofotometría ultravioleta-visible

El análisis por espectrofotometría ultravioleta-visible se realizó mediante un espectrofotómetro UNICAM de la serie 8700 acoplado a una computadora 486 y a través del paquete de programas PU 8710

Falcon. La determinación del espectro de absorción de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas se realizó en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 500 nm. Por su parte, la determinación cuantitativa se realizó a partir de la medición de la absorbancia a 338 nm ($\lambda_{\text{máx}}$) en una cubeta de cuarzo de paso óptico de un centímetro y utilizando hexano libre de aldehídos como disolvente.

El análisis de las distintas muestras se realizó a partir de 10 μ L de ellas y su posterior disolución en dos mililitros de hexano libre de aldehídos. De esta disolución, se tomaron 10 μ L, se colocaron en un tubo de ensayos de 10 mL y se le adicionaron 2 mL de la disolución derivatizadora de 2,4-dinitrofenilhidrazina y 2 mL de hexano tratado. Se agitó el tubo de ensayos durante un minuto y se dejó en reposo durante 15 min a temperatura ambiente. Se colectó la fase orgánica, se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso y se re-disolvió en 0,5 mL de hexano libre de aldehídos. En el momento del análisis se tomaron 50 μ L de la última disolución, se añadieron a una cubeta de cuarzo con un paso óptico de un centímetro y se disolvieron en tres mililitros de hexano tratado.

Validación del método espectrofotométrico empleado en la cuantificación

En la validación del método espectrofotométrico empleado en la cuantificación de los compuestos carbonílicos presentes en el OLEOZON[®], se estudiaron los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación. De forma general, se utilizaron como parámetros de aceptación para la validación del método, los establecidos por la FDA (EE.UU.) y por González y colaboradores.^{16,17}

Linealidad

Se preparó una curva de calibración a partir de aceite de girasol (purificado como se describió previamente) y la adición de concentraciones conocidas de nonanal, en el intervalo de 0,25 a 4,003 mol/L. Debido a que la determinación se realiza a través de la medición de la absorbancia y el intervalo de concentraciones estudiado es amplio y elevado, el primer paso del análisis comprendió la dilución de las muestras en dos órdenes de concentración para de esta forma garantizar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en todo

el intervalo estudiado. Se graficó la absorbancia a 338 nm en función de la concentración del aldehído en la muestra. Se realizó el cálculo de los parámetros estadísticos de la recta de calibración a las muestras diluidas por medio del paquete de programas StatGraphics V 5.0. Como criterios de aceptación en esta prueba se exigió un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99 y un coeficiente de determinación mayor o igual a 0,98. Igualmente, se evaluó la significación del intercepto y la existencia o no de sesgo.

Sensibilidad

La sensibilidad corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo: La sensibilidad analítica se calculó dividiendo la pendiente de la recta obtenida en la curva de calibración por el valor de la desviación estándar de la respuesta en el punto medio de la recta.

Límite de detección. Se determinó de forma experimental sobre la matriz sintética. Se realizó la determinación del analito y se fue disminuyendo su concentración, hasta que el área de la banda de absorción fuera tres veces el valor de la relación señal/ruido.

Límite de cuantificación. Se determinó teóricamente como:

$$LD = \frac{10S_{bl}}{b}$$

donde:

b Pendiente de la curva de calibración.

S_{bl} Desviación típica de la respuesta.

La pendiente b se estimó de la curva de calibración del analito. El estimado de S_{bl} se llevó a cabo mediante dicha curva y se estudió esta, utilizando muestras que contenían el analito en el intervalo correspondiente al límite de cuantificación.

Precisión

Repetibilidad. Este estudio se realizó en las mismas condiciones experimentales, sobre la misma muestra (matriz sintética), en el mismo laboratorio, con los mismos equipos, reactivos y en una misma sesión de trabajo. Se preparó una matriz sintética de aceite de girasol con nonanal a una concentración del aldehído de 2,021 0 mol/L. Se repitió diez veces el procedimiento de determinación del aldehído y se

determinaron los parámetros estadísticos: media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza de los resultados. Este estudio se realizó para un único valor de concentración del patrón (valor medio de la curva de linealidad).

Precisión intermedia. En este estudio se analizaron cinco réplicas durante tres días, sin variar las condiciones experimentales. Se preparó una matriz sintética de aceite de girasol con nonanal a una concentración del aldehído de 2,012 9 mol/L. Se realizó el análisis estadístico con el paquete de programas StatGraphics V 5,0 y se determinaron los parámetros estadísticos: media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza de los resultados para cada día trabajado. Se aplicó la prueba de Fischer para determinar si las medias entre los días eran homogéneas entre sí. Igualmente, se realizaron otras pruebas como las de Cochran, Bartlett y Kruskal Wallis para complementar el análisis estadístico.

Exactitud

Este estudio se realizó mediante un análisis repetido de muestras de concentración conocida del patrón. Se prepararon matrices sintéticas con una concentración conocida de nonanal en un intervalo que contenía el existente en la muestra real (0,25 a 4,01 mol/L). Se determinó el recobrado para cada una de las muestras analizadas a las distintas concentraciones y se graficó la recta de recuperación (Valores teórico en función de los valores prácticos obtenidos). Se determinaron los parámetros: coeficiente de correlación, desviación estándar relativa y límites de confianza del intercepto

y la pendiente. Se realizó finalmente una prueba G o de Cochran para ver si el factor de concentración influía en la variación de los resultados.

Estudio de especificidad

Hasta este análisis se utilizó una matriz sintética compuesta por aceite de girasol libre de aldehídos y cantidades exactamente conocidas de nonanal con el objetivo de validar los distintos parámetros exigidos a cualquier método analítico. No obstante, este análisis previo no tiene validez si no se realizan las determinaciones en muestras reales.

En este estudio, se utilizó una curva de calibración de seis puntos, formada por la muestra representativa de OLEOZON® a la cual, se le adicionaron cantidades crecientes de nonanal (8, 16, 40, 80, 160 y 320 mg), equivalentes a un intervalo de concentraciones de nonanal entre 0,05 y 2,31 mol/L. Se realizaron tres réplicas del ensayo. Se realizó el cálculo de los parámetros estadísticos de la recta de calibración por medio del paquete de programas StatGraphics V 5,0; de donde se obtuvieron el coeficiente de variación y la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis por espectroscopia UV-visible

El espectro UV-visible (Fig. 1) del OLEOZON® derivatizado (OLEOZON®-2,4-DNFH) mostró cinco bandas fundamentales de absorción. Las bandas características de estos derivados son anchas debido a la presencia de una mezcla compleja de analitos. La banda uno, corresponde a la absorción final de las especies carbonílicas del sistema en estudio. Estas bandas son de origen

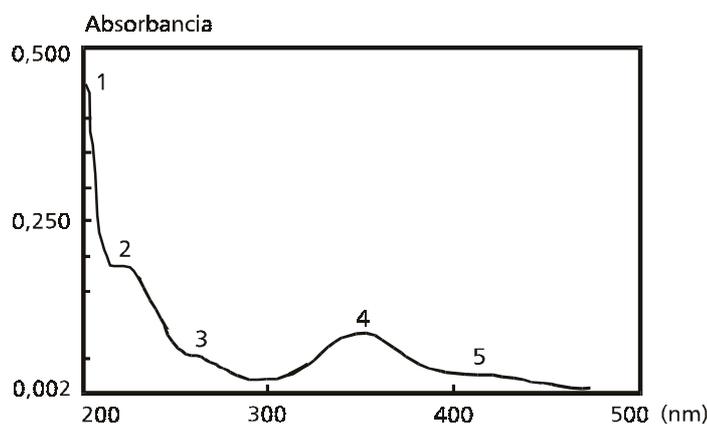


Fig. 1. Espectro UV-visible del OLEOZON®-2,4-DNFH. λ : 190 (1), 222 (2), 256 (3), 348 (4) y 406 (5) nm.

$n-\pi^*$ y se encuentran solapadas con bandas $\pi-\pi^*$ de mayor intensidad que absorben en esta misma región. Las bandas dos y tres son de origen $\pi-\pi^*$ dado que sus coeficientes de extinción molar son superiores a $10\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Por otro lado, las bandas más importantes y características del sistema son la cuatro y la cinco. De estas, la cuatro es la que posee la mayor absorción con un coeficiente de extinción molar conocido ($23\,442\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) para los aldehídos hexanal, heptanal, octanal y nonanal.¹⁵ Esta banda experimenta un corrimiento batocrómico de 10 nm debido a los efectos electrónicos del auxocromo de los derivados de la 2,4-DNFH de los aldehídos insaturados presentes en el OLEOZON®. Este corrimiento no es significativo desde el punto de vista analítico puesto que las diferencias en los valores de absorbancia son mínimas (en el orden de las milésimas) por lo que es posible determinar la absorbancia a 338 nm sin introducir un gran error en la determinación.^{18,19} Es decir que esta banda es la que permite realizar la determinación cuantitativa de los aldehídos presentes en el OLEOZON® o en cualquier otro triglicérido o aceite vegetal ozonizado. De forma general, el espectro UV-Visible del nonanal derivatizado (nonanal-2,4-DNFH), utilizado como patrón en este estudio, resultó muy similar al del OLEOZON® derivatizado y es por ello que no se muestra.

Linealidad del método

El método resultó lineal en el intervalo de concentraciones analizadas, dado que el valor del coeficiente de correlación r y del coeficiente de determinación r^2 estuvieron muy cercanos a la unidad y fueron superiores a los valores exigidos por la FDA, lo que demuestra un buen ajuste de los valores experimentales (Tablas 1 y 2).^{16,17} Igualmente, al aplicar la prueba de significación del intercepto, éste resultó no significativo (Fig. 2) y el intervalo de confianza de "a" incluyó el valor cero, por lo que no existió sesgo.

Sensibilidad del método

Las sensibilidades de calibrado y analítica, obtenidas por este método para las muestras diluidas fueron de 0,075 6 y 333,158 respectivamente. La sensibilidad analítica fue calculada para el punto medio de la curva de calibración.

Límites de detección y cuantificación

Otros aspectos directamente relacionados con la sensibilidad de un método analítico son los límites de detección y de cuantificación. El límite de detección del método para el nonanal fue de $1,04\cdot 10^{-9}\text{ mol/L}$, mientras que el de cuantificación fue de $1,28\cdot 10^{-9}\text{ mol/L}$. Ambos parámetros se encuentran en el orden de los nanomoles por litro; lo que complementa el resultado obtenido para la sensibilidad y corrobora que el método es muy sensible, ya que este analito puede ser detectado a muy bajas concentraciones. Si se tiene en cuenta que la concentración de los compuestos carbonílicos en el OLEOZON® o en sus fracciones, normalmente se encuentra entre 10^{-3} y 2 mol/L , se puede plantear que el método evaluado cumple con los requerimientos para la determinación de este tipo de compuesto en muestras de aceites vegetales ozonizados.⁹

Precisión del método

Estudio de repetibilidad realizado con la matriz sintética

El estudio de repetibilidad realizado con la matriz sintética (Tabla 3) demostró que el coeficiente de variación alcanzado para el análisis de diez réplicas de la concentración estudiada, se encontraba por debajo del 2 % que es el límite máximo permitido para el intervalo de concentraciones estudiados cuando se utiliza una técnica instrumental.¹⁶

Estudio de repetibilidad realizado con la muestra representativa de OLEOZON®

Se realizó la medición espectrofotométrica cuantitativa de los aldehídos totales presentes en una muestra representativa de OLEOZON®, a través del método desarrollado. Se realizaron diez réplicas de la medición (Tabla 4). Se encontró que el coeficiente de variación fue menor del dos por ciento.

Precisión intermedia

Los resultados del estudio de precisión intermedia (Tabla 5), indican que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos en los tres días ensayados (X_m) para un 95 % de confiabilidad, ya que los valores calculados en la prueba de Fisher mostraron que el valor de probabilidad ($p = 0,941\,5$) es mayor de 0,05.

Adicionalmente, los resultados de las pruebas de Cochran (0,474 7 con una probabilidad igual a 0,661 9)

y de Bartlett (1,087 2 con una probabilidad de 0,636 6) indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones estándar de los datos de los tres días ensayados.

Los resultados correspondientes a los estudios de repetibilidad y de precisión intermedia demuestran que el método utilizado cumple con las exigencias para la precisión de un método analítico.

Exactitud del método

En el caso estudiado, la curva de recuperación resultó lineal (Tablas 6 y 7) y los coeficientes de correlación r y de determinación r^2 , fueron muy cercanos a la unidad. Adicionalmente, los recobrados obtenidos fueron todos superiores al 97,7 %.

Los resultados del estudio indican que el método utilizado es exacto en el intervalo de concentraciones estudiadas, ya que el coeficiente de correlación de la recta de calibración, de la cantidad añadida en función de la cantidad determinada, es mayor de 0,99 (0,999 9) y a que el intervalo de confianza del intercepto incluye el valor cero (-8,195 8 a 10,963 8).

Estudio de especificidad

Todos los disolventes empleados en este trabajo fueron tratados para eliminar los aldehídos o cetonas que podrían estar presentes en ellos y la 2,4-dinitrofenilhidrazina utilizada se recristalizó dos veces. Esta última, en las condiciones estudiadas, reacciona solamente con los compuestos carbonílicos que podrían estar presentes en el medio de reacción. En estas muestras no hubo presencia de cetonas, por lo que el método es específico a la determinación de los aldehídos.

Por otra parte, al incrementar la cantidad de nonanal adicionada al OLEOZON®, se observó un incremento lineal de la absorbancia ($r^2 > 0,99$) (Fig. 3). Esta relación lineal es un indicador de que las distintas especies químicas presentes en el producto (peróxidos, ozónidos, perácidos, ácidos carboxílicos y compuestos poli-peroxídicos) no interfieren, en las condiciones estudiadas, en la determinación. Si además, se tiene en cuenta que la concentración máxima de nonanal (adicionada más la existente en el producto) incluye varias veces la concentración de aldehídos presentes en el medicamento, se puede plantear que este ensayo brinda igualmente alguna información sobre las bondades o posibili-

Tabla 1. Resultados del ensayo de linealidad para el nonanal.

C (mol/L)	Réplicas					Xm	DE	CV (%)
	1	2	3	4	5			
	Absorbancia							
0,251 1	0,018	0,019	0,019	0,019	0,019	0,018 8	0,000 4	2,13
0,501 2	0,038	0,037	0,037	0,038	0,038	0,037 3	0,000 5	1,34
1,009 0	0,076	0,076	0,077	0,076	0,076	0,076 3	0,000 4	0,53
2,010 0	0,151	0,151	0,150	0,150	0,151	0,150 7	0,000 5	0,32
2,500 0	0,188	0,188	0,189	0,188	0,187	0,188 3	0,000 6	0,34
4,003 0	0,303	0,302	0,301	0,306	0,303	0,302 0	0,001 7	0,57

C Concentración. Réplicas Réplicas de las mediciones de absorbancia. Xm Valor medio. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación (%).

Tabla 2. Evaluación de la linealidad del método para el nonanal.

C (mol/L)	Absorbancia (338 nm)	Parámetros de la recta	
0,251 1	0,019	$Y = a + bx$	$Y = -0,000 48 + 0,075 6x$
0,501 2	0,037	r / r^2	0,990 / 0,998
1,009 0	0,076	S_b	0,000 2
2,010 0	0,151	$a \pm t_{tab} S_a$	(-0,001 9 - 0,000 9)
2,500 0	0,188	(a) $t_{exp} < t_{tab}$	-0,977 5 < 2,776
4,003 0	0,302	(b) $t_{exp} > t_{tab}$	331,705 > 2,776

C Concentración. r Coeficiente de correlación. r^2 Coeficiente de determinación. S_b Desviación estándar de la pendiente. a Intercepto de la curva. S_a Desviación estándar del intercepto. t_{exp} , t_{tab} parámetros de la prueba t de Student experimentales y tabulados.

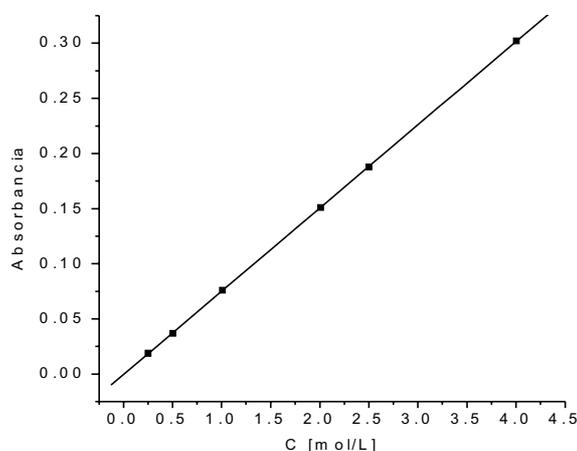

Fig. 2. Gráfico de la linealidad del método.

Tabla 3. Estudio de la repetibilidad del método.

Concentración adicionada — 2,021 0 mol/L					
No.	Cd (mol/L)	No.	Cd (mol/L)	Parámetros estadísticos	
1	1,963	6	1,986	Xm	1,978
2	1,980	7	1,978	DE	0,007
3	1,973	8	1,967	CV(%)	0,38
4	1,985	9	1,979		
5	1,981	10	1,981		

Cd Concentración determinada. Xm Valor promedio. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación (%).

dades del método de determinación empleado.

CONCLUSIONES

Se realizó la validación de un método espectrofotométrico que permite la cuantificación de los aldehídos presentes en el aceite de girasol ozonizado OLEOZON®. Este método es lineal, exacto, preciso, sensible y específico en las condiciones estudiadas, por lo que es fiable para determinar cuantitativamente los aldehídos presentes en el medicamento.

BIBLIOGRAFIA

- Molerio J., Menéndez S., Ledea O.E., Díaz M., Díaz W., Fernández L. A., and Lezcano I. Method for obtaining ozonized vegetable oils and fats and their application for pharmaceutical and cosmetic uses. PCT Patent, PCT/CU 0071, 2002.
- Lezcano I., Nuñez N., Molerio J., Gómez M., Actividad *in vitro* del aceite de girasol ozonizado frente a diferentes especies microbianas, **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **27**, 46, 1996.
- Lezcano I., García G., Martínez G., Molerio J., y col., Efectividad de la manteca de cacao ozonizada para el tratamiento de la candidiasis vaginal, **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **29**, 206, 1998.
- Lezcano I., Nuñez N., Gómez M., and Espino S., *In vitro* activity of OLEOZON® on *S. Aureus* and epidermitis strains, **Ozone Science and Engineering**, **22**, 207, 2000.
- Molerio J., Menéndez S., Díaz W., Ledea O., León F y Pérez O. Registro médico del OLEOZON® pinceladas. Aplicación en epidermofitosis, Comité Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos, Registro Sanitario No. 1498, República de Cuba, 1999.
- Bailey P.S. Ozonation in Organic Chemistry. Volumes 1 and 2, Academic Press, New York, USA, 1978.
- Díaz M., Lezcano I., Molerio J., and Hernández F., Spectroscopy characterization of ozonides with biological

- activity, **Ozone Science and Engineering**, **23**, 35, 2001.
8. Ledea O., Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado OLEOZON®, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **35**, 33, 2004.
9. Ledea O., Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado OLEOZON®, Tesis en opción del título de Doctor en Ciencias Químicas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, julio, 2003.
10. Vogel, M., and Karst, U., Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis –A critical review. **Fresenius J. Anal. Chem.**, **366**, 781, 2000.

11. Allen J.C. and R.J. Hamilton, Rancidity in Foods, Blackie Academic and Professional, London, UK, 2000.
12. Lehotay, J. and Hromulakova, K., HPLC determination of trace levels of aliphatic aldehydes C₁-C₄ in river and tap water using online preconcentration. **J. Liq. Chromatogr.**, **17**, 579, 1994.
13. Stashenko E.E., Ferreira M.C., Sequeda L.G., Martínez J.R. and Wong J.W., Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds, **Journal of Chromatography A**, **779**, 360, 1997.
14. Ledea O., Correa T., Molerio, Jardines D., Escobar M., Rosado A. and Hernández C., Volatile components of ozonized sunflower oil "OLEOZON®", **Ozone Science and Engineering**, **23**, 121, 2001.
15. Mortimer J., Organic Electronic Spectral Data, Vol.1, Interscience publisher Ltd., London, 1960.
16. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Maryland, USA, 1995.
17. González Rolando, Nuevas L., Páneque A., y Velez H., Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos, **Revista Cubana de Farmacia**, **30**, 1, 1996.
18. Schulte E., Determination of higher carbonyl compounds in used frying fats by HPLC of DNPH derivatives, **Anal. Bioanal. Chem.**, **372**, 644, 2002.
19. González M., Determinación del contenido de compuestos carbonílicos en el aceite de girasol ozonizado OLEOZON®, Tesis de Diploma de Licenciatura en Radioquímica, Instituto Superior de Ciencia y Tecnologías Aplicadas, Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, junio, 2003.

Tabla 4. Determinación del contenido de aldehídos en la muestra representativa del OLEOZON®.

No.	Absorbancia	C ₀ (mol/L)	C ₁ (mmol/g)
1	0,088	1,17	1,23
2	0,089	1,18	1,24
3	0,086	1,14	1,20
4	0,088	1,17	1,23
5	0,087	1,16	1,22
6	0,087	1,16	1,22
7	0,086	1,14	1,20
8	0,089	1,18	1,24
9	0,087	1,16	1,22
10	0,080	1,06	1,11
Xm	0,087	1,15	1,21
DE	0,002	0,03	0,04
CV (%)	0,43	1,3	1,4

Xm Valor promedio. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación. C₀ y C₁ Concentración total de aldehídos en la muestra representativa (mol/L y mmol/g respectivamente).

Tabla 5. Reproducibilidad entre días de la determinación de aldehídos (nonanal).

Réplicas	Concentración adicionada — 2,012 9 mol/L		
	Día		
	1	2	3
Concentración determinada			
1	1,95	1,96	1,97
2	1,96	1,99	1,97
3	1,98	1,99	1,98
4	1,98	1,95	1,94
5	1,97	1,96	2,00
Xm	1,97	1,97	1,97
DE	0,01	0,02	0,02
CV (%)	0,51	1,01	1,01

Xm Valor promedio. DE Desviación estándar. CV coeficiente de variación.

Tabla 6. Parámetros estadísticos de la exactitud del método de determinación de aldehídos (nonanal).

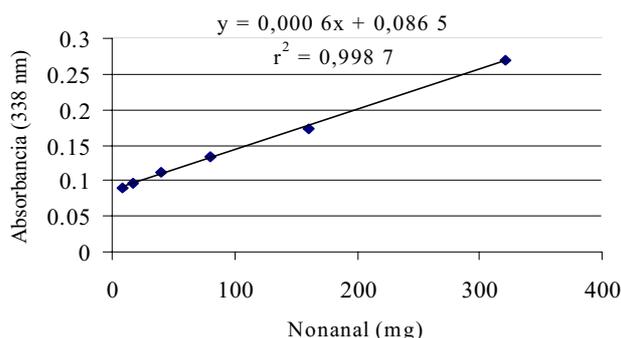
Puntos experimentales	1	2	3	4	5
Moles añadidos · 10 ³	0,251 1	0,500 5	1,030 0	2,010 0	4,010 0
Moles extraídos · 10 ^{3a}	0,245 6	0,490 5	1,011 0	1,976 0	3,929 0
Recobrado (%)	97,8	98,0	98,2	98,3	98,0

^a Media aritmética de tres réplicas.

Tabla 7. Parámetros de la recta en la determinación de la exactitud del método de determinación de aldehídos (nonanal).

Parámetros de la recta	
$Y = a + bx$	$Y = 1,384 + 0,980x$
r/r^2	$r = 0,999\ 9 \quad r^2 = 0,999\ 6$
S_b relativa	$S_b = 0,001$
$b \pm t_{\text{tab.}} S_b$	$(0,980 \pm 0,005)$
$T_{\text{exp.}}(a) < t_{\text{tab.}}$	$0,621\ 7 < 4,303$
$a \pm t_{\text{tab.}} S_a$	$(1,384 \pm 9,579\ 8)$

r Coeficiente de correlación. r^2 Coeficiente de determinación. S_b Desviación estándar de la pendiente. $t_{\text{exp.}}, t_{\text{tab.}}$ Parámetros experimentales y tabulados de la prueba t de Student.


Fig. 3. Dependencia de la absorbancia a 338 nm con el incremento de la cantidad de nonanal adicionado al OLEOZON®.

ozoney®
 NUEVO OZONIZADOR DOMÉSTICO

OZONEY® está diseñado para desinfectar pequeños volúmenes de agua para beber, lavar los alimentos que se ingieren crudos, enjuagar la vajilla y los utensilios de cocina, así como para la higiene bucal y otros usos.

OZONEY® puede convertirse en un gran aliado para la salud, ya que permite obtener agua de elevada calidad sin tener que hervir el agua o adquirir agua embotellada, porque al emplearlo se dispone de todas las ventajas que proporciona el ozono, entre las que se encuentra su elevado poder germicida. Su poder desinfectante es mayor que el de todos los agentes de este tipo que se emplean hasta el momento.

OZONEY® es ideal para oficinas, el hogar u otros lugares donde se requieran pequeños volúmenes de agua para consumo humano con elevada calidad.

Las concentraciones de ozono disuelto que se alcanzan con él, aseguran una desinfección total del agua tratada.



Características técnicas
 Alimentación: 110 V-CA +/- 10 %
 Frecuencia: 50 Hz .
 Concentración de ozono en el agua: 0,4 ppm (mínimo).
 Caudal de agua recomendado: 1,5 a 2 L/min .
 Potencia: 10 VA (máximo).
 Dimensiones: (195X285X185) mm .
 Peso: 1,8 kg .



Centro de Investigaciones del Ozono

Calle 230 y 15, No. 1313, Siboney, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfonos: (53-7) 271-9264; 271-2089. Fax: (53-7) 271-0233. E-mail: ozono@infomed.sld.cu <http://www.ozono.cubaweb.cu>