

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRAFÍA DE GASES CAPILAR
PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOESTEROLES EN
SEMILLAS DE *LUFFA CYLINDRICA*

ANDRÉS MAURICIO ARIAS GONZÁLEZ
DIANA MARGARITA GIL CAÑAS

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2012

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRFÍA DE GASES CAPILAR
PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOESTEROLES EN
SEMILLAS DE *LUFFA CYLINDRICA*

ANDRÉS MAURICIO ARIAS GONZÁLEZ

DIANA MARGARITA GIL CAÑAS

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Químico Industrial

Director:

JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ
Químico M.Sc.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

PEREIRA

2012

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivo específicos	15
4. MARCO TEÓRICO	16
4.1 ESTANDARIZACIÓN	16
4.1.1 Precisión	16
4.1.1.1 Repetibilidad	17
4.1.1.2 Precisión intermedia	17
4.1.1.3 Reproducibilidad	17
4.1.2 Exactitud	17
4.1.3 Límite de detección	17
4.1.4 Límite de Cuantificación	18
4.1.4.1 Método basado en la relación señal /ruido	18
4.1.4.2 Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado	18
4.1.4.3 Método basado en la extrapolación de la recta calibrado a concentración cero	18
4.1.5 Linealidad y Rango	19
4.1.5.1 Procedimiento de determinación de la linealidad	19
4.1.5.2 Evaluación estadística de la linealidad	20
4.1.5.2.1 Ecuación de la recta pendiente y ordenada en el origen	20
4.1.5.2.2 Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2)	20
4.1.6 Sesgo	21
4.1.7 Porcentaje de recuperación	21
4.1.8 Sensibilidad	21
4.2 TECNICAS CROMATOGRÁFICAS	21
4.2.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	22
4.2.1.1 Fase estacionaria de extracción en fase sólida (SPE)	22
4.2.1.1.1 Características químicas del sorbente	23
4.2.1.1.2 Mecanismos de extracción	23
4.2.1.1.2.1 Fase normal	24
4.2.1.1.3 Extracción en fase sólida para esteroides (SPE)	24
4.2.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD)	25

4.2.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)	25
4.2.3.1 Instrumentación de la cromatografía de gases	26
4.2.3.1.1 Fase móvil (gas portador)	27
4.2.3.1.2 Sistema de inyección de muestra	27
4.2.3.1.3 Columna cromatográfica	28
4.2.3.1.3.1 Fase estacionaria	28
4.2.3.1.4 Detectores	28
4.2.3.1.4.1 Detector de ionización de llama (DIL)	28
4.2.3.2 Análisis cualitativo	30
4.2.3.3 Análisis cuantitativo	30
4.3 MATRIZ DE ESTUDIO: <i>LUFFA CYLINDRICA</i>	30
4.3.1 Descripción de la <i>luffa cylindrica</i>	30
4.4 LÍPIDOS	31
4.4.1 Lípidos insaponificables	32
4.5 Esteroides	32
4.5.1 Esteroles	33
4.5.1.1 Fitoesteroles	33
4.5.1.1.1 β - Sitoesterol	34
4.5.1.1.2 Ergosterol	34
4.5.1.1.1 Estigmasterol	35
4.6 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	36
4.6.1 Método soxhlet	36
4.7 DERIVATIZACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA DE GASES	36
4.7.1 Derivatización de esteroles	37
5. METODOLOGÍA	35
5.1 Estándares de fitoesteroles	38
5.2 Análisis cromatográfico	38
5.2.1 Niveles de concentración de fitoesteroles	39
5.2.2 Curva de calibración de los estándares de fitoesteroles	39
5.2.2.1 Precisión	40
5.2.2.2 Límite de detección y cuantificación	40
5.2.2.3 Sensibilidad	40
5.2.2.4 Linealidad	40
5.2.2.5 Exactitud	40
5.3 ANÁLISIS DE LA MUESTRA (SEMILLAS DE <i>LUFFA CYLINDRICA</i>)	40
5.4 Tratamiento preliminar de las semillas de <i>luffa cylindrica</i>	41
5.5 Extracción del aceite de semillas de <i>luffa cylindrica</i>	41
5.6 Extracción de la materia insaponificable	42
5.7 Extracción en fase sólida para la obtención de fracción de fitoesteroles	42
5.8 Caracterización previa de las fracciones obtenidas por cromatografía de capa delgada	42

5.9 Derivatización de las fracciones de fitoesteroles	43
5.10 Análisis cromatográfico de la muestra de <i>luffa cylindrica</i>	43
5.10.1 Análisis cualitativo	43
5.10.2 Análisis cuantitativo	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1 Análisis cromatográfico de los estándares	44
6.2 Curvas de calibración del coctel de los estándares de fitoesteroles	45
6.3 Tratamiento estadístico	48
6.3.1 Calculo de los límite de detección y cuantificación	48
6.3.2 Coeficiente de correlación lineal	49
6.3.3 Precisión	50
6.3.4 Sensibilidad	50
6.3.5 Sesgo	50
6.3.6 Exactitud	52
6.4 ANÁLISIS DE UNA MUESTRA REAL	53
6.4.1 Descripción de la materia insaponificable	54
6.4.2 Caracterización preliminar de las fracciones obtenidas por cromatografía de capa delgada.	55
6.4.2.1 Sistema uno (Acetato de etilo)	55
6.4.2.2 Sistema dos(Diclorometano)	56
6.4.3 Porcentaje de Recuperación.	58
6.5 Análisis del aceite de semillas de <i>luffa cylindrica</i>	58
7. CONCLUSIONES	65
8. RECOMENDACIONES	66
9. BIBLIOGRAFÍA	67
10. ANEXOS	75
Anexo1	75
Anexo 2	76
Anexo 3	78
Anexo 4	79
Anexo 5	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Cartuchos para la extracción en fase solida (EFS)	23
Figura 2: Molécula de silano	23
Figura 3: Cartuchos utilizados para la extracción en fase sólida (EFS)	25
Figura 4: Esquema general de un cromatógrafo de gases	26
Figura 5: Sistema de inyección	27
Figura 6: Detector ionización de llama	29
Figura 7: Fruto madurado y semillas de <i>luffa cylindrica</i>	31
Figura 8: Estructura de un triglicérido (glicerol y ácidos grasos)	32
Figura 9: Estructura química ciclopentanoperhidrofenantreno	32
Figura 10: Estructura química de un esteroil	33
Figura 11: Moléculas de fitoesteroles (Campesterol y dihidrocolesterol)	34
Figura 12: Molécula de β -Sitosterol	34
Figura 13: Molécula de Ergosterol	35
Figura 14: Molécula de estigmasterol	35
Figura 15: Extracción soxhlet	36
Figura 16: Reacción de derivatización a un esteroil	37
Figura 17: Cromatógrafo de gases – FID	39
Figura 18: Ubicación del municipio de Marsella	41
Figura 19: Semillas de <i>luffa cylindrica</i>	41
Figura 20: Cromatogramas de los estándares de fitoesteroles	44
Figura 21: Curva de calibración del 5 α colestano	47
Figura 22: Aceite de <i>luffa cylindrica</i>	54
Figura 23: Materia insaponificable del aceite de semillas de <i>luffa cylindrica</i>	54
Figura 24: Placa cromatográfica revelada con ácido fosfomolibdico de fracciones obtenidas para el sistema uno	55
Figura 25: Placa cromatográfica revelada con ácido fosfomolibdico de fracciones obtenidas para el sistema dos	57
Figura 26: Cromatograma de la fracción de diclorometano.	59
Figura 27: Espectro de masas del compuesto “Ergost-7-en-3-ol, (3.beta., 5.alpha)”	60
Figura 28: Principales fragmentos del compuesto “Ergost-7-en-3-ol, (3.beta., 5.alpha)”	61
Figura 29: Espectro de masas del compuesto “Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta., 5.alpha., 22E)”	61
Figura 30: Principales fragmentos del compuesto “Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta., 5.alpha., 22E).”	62
Figura 31: Espectro de masas del compuesto “Ergosta-5,24(28)-dien-3.beta.-ol”	62

Figura 32. Principales fragmentos del compuesto “Ergosta-5,24(28)-dien-3.beta.-ol.”	63
Figura 33. Espectro de masas del compuesto “Lanosterol.”	63
Figura 34. Principales fragmentos del compuesto “Lanosterol.”	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Condiciones de operación del cromatógrafo de gases para el análisis de los estándares de fitoesteroles	38
Tabla 2: Niveles de concentración de los patrones	39
Tabla 3: Sistemas de elución para obtener las fracciones de fitoesteroles	42
Tabla 4: Tiempos de retención y área de cada uno de los estándares de fitoesteroles	45
Tabla 5: Datos de las áreas obtenidas de cada uno de los patrones de fitoesteroles para la elaboración de las curva de calibración	46
Tabla 6: Datos de las áreas obtenidas de cada uno de los patrones de fitoesteroles para el cálculo de la repetibilidad.	47
Tabla 7: Resultados estadísticos obtenidos para las curva de calibración	48
Tabla 8: Resultados estadísticos obtenidos para el test de linealidad	49
Tabla 9: Resultados estadísticos obtenidos para el cálculo de sesgo experimental	51
Tabla 10: Datos obtenidos para el cálculo del test de sesgo	52
Tabla 11: Resultados estadísticos obtenidos para el cálculo de exactitud	53
Tabla 12: Datos obtenidos para la materia insaponificable	55
Tabla 13: Datos de porcentaje de recuperación para el estándar estigmasterol	58
Tabla 14: Análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la materia insaponificable del aceite de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i>	60

**NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRFÍA DE GASES
CAPILAR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
FITOESTEROLES EN SEMILLAS DE *LUFFA CYLINDRICA***

Presentado por:

ANDRÉS MAURICIO ARIAS GONZÁLEZ

DIANA MARGARITA GIL CAÑAS

Los suscritos, director y jurados del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de _____

Con la connotación de _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

Director:

Juan Pablo Arrubla Vélez _____

Jurado:

Firma: _____

DEDICATORIA

*Dedicado a el Eterno e incomprensible Dios,
Que cuida detrás del velo cada uno de nuestros pasos.....*

A la chispa divina en cada uno de los seres (padres, docentes, amigos, compañeros) que me han acompañado a lo largo de mis procesos con consejos, dificultades y experiencias que han contribuido en menor o mayor grado a lo que hoy soy como persona y profesional.

Diana Margarita Gil Cañas

A mi madre Luz Marina, por se mi apoyo, guía, compañía y brindarme todo su amor de madre que me alienta a seguir construyéndome como persona te amo mamá.

A mi tía María Lyda por brindarme compañía, cariño, confianza y un apoyo incondicional para la finalización de esta etapa de mi vida... mil gracias tía.

A mi hermano Víctor por brindarme apoyo incondicional y ser guía en momentos de dificultad en toda esta etapa de mi vida.

A mi novia y mi gran compañía Ángela por brindarme apoyo, su amor, comprensión, confianza, consejos, paciencia y otras de miles de cosas que me hicieron crecer como persona y profesionalmente... te amo amor mío.

Andrés Mauricio Arias González

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres por darnos apoyo y palabras de aliento en diferentes momentos de dificultad a lo largo de estos años de estudios.

A nuestro director Juan Pablo Arrubla Vélez por el apoyo y conocimiento brindado para la realización del proyecto.

A nuestra evaluadora, la Doctora Gloria Guerrero quien con sus conocimientos y apoyo incondicional nos dio las herramientas fundamentales para culminar nuestro proyecto.

A Paula Andrea Giraldo que con paciencia nos enseñó a operar el cromatógrafo de gases y nos brindó su conocimiento como experiencia en el campo de la investigación.

A Javier por su colaboración a lo largo de nuestros estudios.

Al Grupo de Investigación de Oleoquímica y a todas las personas que contribuyeron al cumplimiento de nuestras metas.

A nuestros amigos y compañeros (Ángela, Leidy, Melissa, Paola, Diana L., Angélica, Ana María, Sebastián, Laura M., Mónica A., Fabio, Pedro) que marcaron nuestro paso por la universidad.

RESUMEN

Se estandarizó la técnica por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) para el análisis de fitoesteroles, se calcularon parámetros estadísticos, como la precisión, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, repetibilidad, linealidad, reproducibilidad, sesgo y exactitud, logrando valores tolerables para éstas medidas, permitiendo el uso de la técnica para el análisis de matrices oleosas.

Se evaluó el porcentaje de recuperación de fitoesteroles con la técnica de extracción en fase sólida (EFS), utilizando cartuchos de silica, la técnica mostró un buen porcentaje de recuperación de 110,15% con coeficientes de varianza menores al 2%.

Se realizó el análisis cromatográfico del aceite extraído de las semillas de *Luffa cylindrica* como muestra real, la cual fue sometida al proceso de saponificación para la extracción de su materia insaponificable, posteriormente fue derivatizado, obteniéndose como fitoesterol mayoritario el β sitoesterol reportando un contenido en el aceite de semillas de *Luffa cylindrica* de 2551,1 mg de β -sitoesterol por Kg de aceite y un contenido en las semillas base seca 222,91 mg β -sitoesterol por Kg de semillas, seguido de estigmasterol reportando un contenido de 211,19 mg de estigmasterol por Kg de aceite y en las semillas de *Luffa cylindrica* 18,45 mg de estigmasterol por Kg de semilla.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los fitoesteroles o esteroides vegetales están presentes en las plantas, aceites vegetales, semillas, frutos secos, cereales y legumbres, además de encontrarse en productos elaborados como margarina, bebidas de soya, aliños, y productos lácteos [1]. Los esteroides vegetales (fitoesteroides) son importantes productos agrícolas para las industrias de la salud y la nutrición; [2] también son emulsionantes útiles para la elaboración de cosméticos y esteroides precursores para la producción de fármacos hormonales [26].

Este nuevo espectro de aplicaciones ha generado la necesidad de controlar, caracterizando y cuantificando este tipo de sustancias en diversas matrices dentro de las que se encuentran las de tipo cosmético, alimenticio y farmacéutico. Las entidades que han estado a la vanguardia en este aspecto han sido Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO), la World Health Organization y la Food And Drug Administration (FDA) y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), las cuales han establecido métodos de análisis del contenido de esteroides en grasas de origen vegetal, estos métodos que incluyen cromatografía de gases (GC) están comprendidos en la International Organization Of Standardization (ISO 12228: 1999), la American Oil Chemists Society (AOCS Ch 6-91 (97)) y método del Codex Tipo II.

A nivel nacional se sabe que CENIPALMA ofrece el servicio de análisis de este tipo de sustancias (fitoesteroides), no obstante no hay otras entidades que analicen estas moléculas tan importantes en los ámbitos de la salud y nutrición, por lo anterior la Universidad Tecnológica de Pereira cuenta con el Grupo de Investigación en Oleoquímica, donde actualmente se han estado adelantando investigaciones que involucran los fitoesteroides, no obstante no se tiene una técnica analítica, moderna, robusta y sensible para el análisis de este tipo de moléculas. Es por ello que se hace necesaria la estandarización de la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), ampliando el portafolio de análisis que permita el soporte técnico y científico del grupo de investigación, hacia la comunidad académica e industrias productivas que se verían beneficiadas por este tipo de investigación

2. JUSTIFICACIÓN

El consumo de productos que contienen esteroides y grasas por parte de los seres humanos ha aumentado desde 1950 y a partir de ese mismo año se han venido desarrollando diferentes estudios y aplicaciones sobre los esteroides vegetales, en la industria cosmética, productos para la salud y alimenticios [3]. Los esteroides (colesterol y fitoesteroides) son componentes importantes que contribuyen con propiedades nutricionales y ayudan con la estabilidad de muchos productos alimenticios como las grasas y aceites; la mayoría de los productos alimenticios son de origen animal y vegetal, los primeros que provienen de fuentes animales contienen, como esteroles principales al colesterol y los segundos de origen vegetal contienen gran cantidad de fitoesteroides (esteroides vegetales) compuestos parecidos al colesterol que abarcan en mayor proporción los lípidos insaponificables, es decir, son lípidos que carecen de ácidos grasos en su estructura [4].

Los esteroides vegetales o fitoesteroides desempeñan importantes funciones en varios ámbitos, como la farmacéutica (producción de esteroides), la nutrición (su actividad de tipo hipocolesterolémica que está relacionada como agentes efectivos para reducir el colesterol, que ofrece beneficios al sistema cardiovascular[26] y en procesos de la inhibición del efecto oxidativo, agentes antipolimerizantes de los aceites de fritura), la medicina (numerosos beneficios fisiológicos tales como anti-inflamatorios, anti-bacterianos, antioxidantes, antitumorales y fungicidas [5]) y en la industria cosmética (cremas, sombras de ojos, lápiz de labios y polvos) [6].

Dada la gran utilidad de los fitoesteroides en los campos de la nutrición, farmacéutica y la cosmética, existe la posibilidad de que diferentes productos alimenticios, de belleza y salud, a los cuales se les adicionan fitoesteroides, con el fin de mejorar sus propiedades organolépticas. Sin embargo aunque algunos productos presenten en su etiqueta contenido de fitoesteroides en muchos casos se presentan adulteraciones. Otro aspecto destacable lo constituye la continua investigación en Oleoquímica, particularmente en la caracterización de fitoesteroides de diferentes fuentes agroindustriales y sus posibles aplicaciones en las ramas alimenticias, cosmética y farmacéutica. Para el apoyo de este tipo de investigaciones se requiere de técnicas analíticas modernas, sensibles, de alta resolución que permitan cualificar y cuantificar fitoesteroides.

La técnica más utilizada es la cromatografía de gases para la identificación, cuantificación y cualificación de fitoesteroides en matrices alimenticias [11]. En tanto que la técnica más utilizada para la extracción de fitoesteroides es la extracción fase sólida (SPE) puesto que otras técnicas como la de cromatografía de columna (CC) presenta baja recuperación de analito y requiere mucho tiempo, mientras que la extracción en fase sólida (SPE) ha demostrado ser una alternativa viable para los análisis de aceite vegetal debido a la separación y enriquecimiento de los esteroides vegetales [4], [12].

A nivel nacional se sabe que CENIPALMA ofrece el servicio de análisis de este tipo de sustancias (fitoesteroles), no obstante no hay otras entidades que analicen estas moléculas tan importantes en los ámbitos de la salud y nutrición [8,9]. Sin embargo estos compuestos han surgido como una herramienta para el control de las enfermedades de tipo cardiovascular, por ello existe un creciente interés en algunas áreas de mercado por los compuestos de tipo esteroles vegetales, de acuerdo a esta situación el Grupo de Investigación de Oleoquímica ha realizado diversos estudios sobre diferentes semillas en cuanto al contenido de este tipo de compuestos habiéndose encontrado que la semilla de *Luffa cylindrica* tiene un buen contenido de materia insaponificable y por tanto de fitoesteroles, por lo tanto se escogió como matriz de estudio para establecer una técnica analítica que contribuya ampliar el portafolio de análisis, que permita el soporte técnico científico del grupo de investigación, hacia la comunidad académica e industrias productivas que se verían beneficiadas por este tipo de investigación.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Estandarizar la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) en la cualificación y cuantificación de cinco fitoesteroles.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener en forma experimental los valores de los parámetros de la técnica cromatográfica como: precisión, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, repetibilidad, reproducibilidad, sesgo, porcentaje de recuperación, linealidad y exactitud; para los resultados cuantitativos obtenidos.
- Extraer el aceite de las semillas de *luffa cylindrica*, obtener su materia insaponificable verificando su porcentaje de rendimiento y caracterizar los principales fitoesteroles en la fracción insaponificable.
- Evaluar la técnica de extracción en fase sólida (SPE), en cuanto al porcentaje de recuperación del analito desde el aceite de semillas de *luffa cylindrica*.
- Evaluar el contenido de fitoesteroles de muestras reales y compararlas con la literatura científica.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 ESTANDARIZACIÓN

Estandarizar un método analítico consiste en verificar y documentar, que este conduzca con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el procedimiento, la matriz de estudio, el analito, la cantidad de parámetros de la estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo mas o menos considerable.

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual se obtiene información. La estandarización de las metodologías analíticas, junto a otras actividades englobadas en la gran área del aseguramiento de la calidad permite conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confiere un grado elevado de afinidad entre los resultados de los análisis químicos.

Siguiendo un método previamente estandarizado se puede alcanzar buenos resultados pero hace falta demostrar que funcionan en un ámbito de trabajo. Por tanto, un método siempre debe estandarizarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de calidad se adecuan al problema analítico particular que se debe resolver en el laboratorio [13, 17].

4.1.1 PRECISIÓN

La precisión describe la reproducibilidad de los resultados; es decir, la concordancia entre los valores numéricos de dos o más medidas replicadas o medidas que se han realizado exactamente de la misma forma. En general, la precisión de un método analítico se obtiene fácilmente mediante la simple repetición de la medida [14].

Normalmente se utilizan tres términos para describir la precisión de un conjunto de datos replicados que incluyen la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación [14]. El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo, esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a dicho método de ensayo. Generalmente los factores que influyen para la existencia de estos errores en los resultados del ensayo no pueden ser siempre controlados de aquí la importancia del estudio de la precisión. La precisión engloba diferentes tipos de estudios como la repetibilidad, reproducibilidad y la precisión intermedia [15].

4.1.1.1 Repetibilidad

Es la precisión que estudia la variabilidad del método obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos corto de tiempo, por un mismo analista, en la misma muestra homogénea en un mismo laboratorio y en el mismo equipo. La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas [15].

4.1.1.2 Precisión intermedia

Es la precisión que estudia la variabilidad del método obtenida bajo diferentes condiciones de operación con diferentes analistas, aparatos, días, pero en un mismo laboratorio [15].

4.1.1.3 Reproducibilidad

Es la precisión que estudia la proximidad existente entre los resultados provenientes de diversas mediciones en las cuales se han variado algunas condiciones de operación y en diferentes laboratorios [15].

4.1.2 EXACTITUD

La exactitud describe si el resultado experimental es el correcto o expresa la proximidad de este al valor verdadero o de referencia estrictamente hablando, el único tipo de medida que puede ser completamente exacto es aquel que consiste en el recuento de objetos. Todos los demás tipos de medidas contienen errores y aportan sólo una aproximación de valor verdadero [14].

La exactitud es un término relativo, el sentido de que un método es exacto o inexacto dependiendo en gran medida de las necesidades del analista y de las dificultades del problema analítico [14]. La exactitud se expresa en términos de errores absolutos y relativos; El error absoluto (E_a) de una medida es la diferencia entre el valor verdadero y un conjunto de valores que se han medido, se expresa mediante la relación $E_a = \bar{X} - X_t$ y el error relativo es el cociente entre el error absoluto de la medida y el valor verdadero este suele expresarse en términos de porcentaje y se da por la relación Error relativo = $\frac{\bar{X} - X_t}{X_t}$ [14].

4.1.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)

El límite de detección (LD) es sólo una medida cualitativa y se entiende como la mínima concentración o la mínima masa de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dada. El límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco

[14]. Su determinación se realiza por la relación entre el ruido y la señal debida al analito; se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.) [16].

4.1.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)

El límite de cuantificación (LC) es un término cuantitativo y se entiende como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud se expresa en unidades de concentración [15]. Hay diversos métodos de análisis para hallar tanto el límite de detección como el de cuantificación, entre los métodos más comunes se presentan los siguientes:

4.1.4.1 Método basado en la relación señal /ruido

Este método, uno de los más conocidos y empleados, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero de analito. En el caso de métodos cromatográficos para el límite de cuantificación (LC) será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 10 veces superior, y que el límite de detección (LD) será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a este.

Este procedimiento presenta la desventaja de que en numerosas ocasiones al llevar a cabo la comprobación experimental del límite de cuantificación calculado, se observa que es posible obtener resultados igualmente precisos y exactos aún cuando desciende más en la concentración límite, es decir, que en ocasiones una señal inferior 10 veces el ruido de fondo proporciona resultados exactos y precisos, con lo que parte del trabajo realizado debe ser reconducido si se quiere llegar realmente a conocer el límite del método [15].

4.1.4.2 Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado.

De acuerdo con la unión internacional de química pura y aplicada (IUPAC), puede calcularse el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo y la pendiente de la recta de calibrado del analito [15].

4.1.4.3 Método basado en la extrapolación de la recta calibrado a concentración cero

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigidos a evitar el

cálculo, en ocasiones costosos en tiempo, de la señal media del blanco y su desviación estándar. Para ello, el método utiliza la pendiente de una recta de calibrado realizada a niveles de concentración cercanos a los límites esperados pero sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultante de la extrapolación de dicha recta. La intersección con el eje "Y" corresponderá al valor de la respuesta a concentración cero de analito [15], y los pasos para realizar dicho método son:

- 1) Se determina la pendiente de cada una de las curvas de calibración de los compuestos en análisis.
- 2) Se obtiene otra curva y ecuación de calibración; pero esta vez con los tres patrones de menor concentración, extrapolando la respuesta a concentración a cero de la recta de calibrado y así se obtiene la señal ruido correspondiente al término independiente de la ecuación de la recta de calibrado (Y_{bl}).
- 3) Se calcula la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido, construyéndose una recta concentración de patrones menores vs desviación estándar de las respuestas, se extrapola la desviación estándar a concentración cero y se obtiene el valor medio de la señal ruido (S_{bl}), aplicando las siguientes formulas se obtiene:

$$(LD) = \frac{Y_{bl} + (3 * S_{bl})}{b * \sqrt{n}} (LC) = \frac{Y_{bl} + (10 * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

4.1.5 LINEALIDAD Y RANGO

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente o por medio de transformaciones matemáticas proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se buscare una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación [15].

El rango o intervalo lineal de un método analítico, que va desde la concentración más pequeña a la que se puede realizar medidas cuantitativas (límite de cuantificación) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito [14, 15].

4.1.5.1 Procedimiento de determinación de la linealidad

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado.
- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada realizando diluciones.
- El número de repeticiones de cada muestra dependerá de la precisión del sistema empleado, y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento analítico a validar.

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente) y las respuestas y (variable dependiente). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = b \cdot x + a$, obtenida por un método de ajuste, si la recta no pasa cerca por el origen significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado [15].

4.1.5.2 Evaluación estadística de la linealidad

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística:

4.1.5.2.1 Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen

En la recta de regresión $y = b \cdot x + a$, donde x es la concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente (asociada con la sensibilidad del método) y a el término independiente (asociado al error sistemático) [15].

4.1.5.2.2 Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2)

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable x (concentración) y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es $> 0,999$, aunque en el caso de impurezas se admite $> 0,990$. La información obtenida mediante el coeficiente de correlación es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo el coeficiente de determinación (r^2) el que aporta una mayor significación estadística, ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo [15].

4.1.6 SESGO

Consiste en error sistemático el cual es medido a partir de la diferencia entre el valor teóricamente esperado y el valor verdadero correcto o asumido. Se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{Sesgo} = \mu - x_t$$

Donde μ es la media de la población de la concentración de un analito en una muestra cuya concentración verdadera es x_t [14,17].

4.1.7 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Es la medición que se obtiene al evaluar la concentración del analito en la porción de la muestra o adicionando a ésta, que es cuantificada por el método de ensayo. Una vez se han evaluado las características iniciales de la matriz a examinar, sumada a la cantidad de analito suministrada adicionalmente, se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%R = ((CF-CU)/CA) * 100$$

Donde:

- CF = Concentración del analito medida en la muestra fortificada.
- CU = Concentración de analito medida en la muestra sin fortificar.
- CA = Concentración de analito adicionada [14].

4.1.8 SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un instrumento o de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. Dos factores limitan la sensibilidad: la pendiente de la curva de calibrado y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida. Entre dos métodos que tengan igual precisión será más sensible aquel cuya curva de calibrado tenga mayor pendiente [14]. La definición cuantitativa de la sensibilidad, aceptada por la Unión Internacional De Química Pura Aplicada (IUPAC), es la de sensibilidad de calibrado, que se define como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio [14].

4.2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía se caracteriza por la presencia de dos fases, dispuestas de forma que mientras una permanece fija dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil). La clave de la separación en cromatografía es la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (equilibrio de distribución). En general, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente (más

retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (menos retenidos) se mueven con mayor rapidez. Por consecuencia, el medio cromatográfico (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación y mediante el uso de un detector, su caracterización química [19].

4.2.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica de separación que se basa en los principios de la cromatografía líquida, el principio de la extracción en fase sólida (EFS) responde a las interacciones de uniones lábiles (tipo Van der Waals, electrostáticas, iónicas, Hidrófobas, etc.) entre los constituyentes de una fase líquida (muestra) y una fase estacionaria sólida, ésta técnica se aplica pasando una disolución que contiene analitos sobre una fase sólida que los absorbe específicamente. La fase sólida generalmente sílice con agrupaciones químicas de tipo apolar (cadenas alquilo), de polaridad intermedia (-OH, -CN, -NH₂, diol) o incluso muy polares esta suele estar compactada en el fondo de una pequeña columna de plástico (figura 1). Después de la absorción, los analitos se eluyen con unas pequeñas cantidades de otros disolventes extractor, con el que interaccionan mas fuertemente que con las fase estacionaria. Por tanto la extracción en fase sólida (EFS) no lo consigue un cambio de matriz del analito, sino que reduce el volumen de muestra [20].

La extracción en fase sólida (EFS) es muy empleada en la preparación de muestras para el análisis por cromatografía líquida, de gases, electroforesis y aun para espectrometría de masas. La extracción en fase sólida (EFS) se ha convertido en una de las técnicas para el clean up y concentración de muestras más utilizadas por los químicos analíticos [16].

Los principales objetivos de la extracción en fase sólida (EFS):

- Eliminación de componentes que interfieren con la matriz.
- Concentración selectiva y aislamiento de los analitos.
- Cambio de la matriz del analito según sea necesario para posterior análisis [20]

4.2.1.1 Fase estacionaria de extracción en fase sólida (EFS)

La fase estacionaria se puede presentar en una columna de vidrio o más frecuentemente, en la actualidad, en cartuchos de uso único de polipropileno u otro polímero inerte. La estructura de un cartucho de extracción en fase sólida es la mostrada en la figura 1.

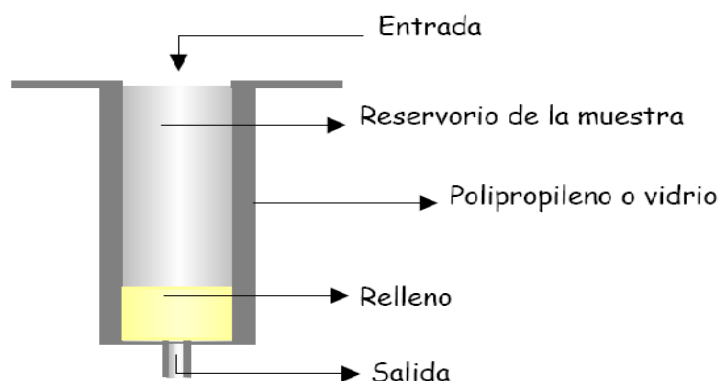


Figura 1. Cartuchos para la extracción en fase sólida (SPE)

Los rellenos de los cartuchos de extracción son polímeros tridimensionales que generalmente están constituidos por dos tipos de materiales; Sílica o Resinas orgánicas. Las interacciones que se produzcan entre el analito y el relleno del cartucho están condicionadas por el tipo de material que componga el relleno y por los grupos funcionales que presente la muestra a purificar [63].

4.2.1.1.1 Características químicas del sorbente

- **Sorbentes basados en Sílica.**

Son los más populares porque son rígidos, económicamente favorables, reproducibles, estables y son inmunes tanto a encogerse como a hincharse con solventes acuosos u orgánicos. Los rellenos de sílica están formados por partículas de sílica modificadas químicamente con grupos funcionales unidos covalentemente a la superficie formando grupos silano (figura 2). Las características de estos grupos funcionales son muy variadas: grupos apolares (C18), polares (NH₂), iónicos (ácido propilsulfónico) ó fases mixtas (C8/intercambio catiónico). El carácter de la sílica depende exclusivamente de los grupos funcionales ligados.

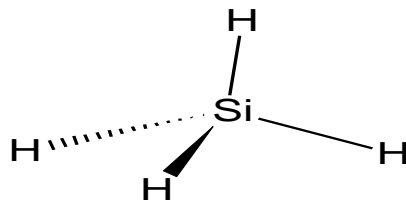


Figura 2. Molécula de silano

4.2.1.1.2 Mecanismos de extracción

Con cualquiera de las estrategias se pueden utilizar tres modos cromatográficos distintos; Fase normal, fase reversa e intercambio iónico. La selección de la

estrategia, modo, relleno y solventes de elución depende tanto de las características de la muestra como del objetivo de la separación.

4.2.1.1.2.1 Fase normal

Es normalmente empleado para extractos de analitos polares con solventes orgánicos no polares. Los mecanismos de retención están basados en puentes de hidrógeno y uniones dipolo-dipolo entre los analitos polares y las fases estacionarias polares (debido a los grupos hidroxilo que presentan) tales como sílica o alúmina. Existe un gran número de fases disponibles, entre las cuales destacan los tipos aminopropil (NH₂), cianopropil (CN), sílice (SiOH) o Diol, que permiten interacciones más o menos fuertes. La optimización de la separación consiste en escoger el tipo de fase adecuada, así como los solventes apropiados tanto para los lavados como para la elución. Los analitos pueden ser eluidos con el uso de concentraciones relativas bajas de solventes orgánicos polares en combinación con solventes orgánicos no polares.

- **Características de los cartuchos de sílica**

Los cartuchos de sílica son generalmente considerados como los sorbentes más polares disponibles.

- Su estructura es: H₃SiOH
- Las interacciones son de tipo polar.
- Es uno de los mejores sorbentes para separar compuestos con estructura química similar.
- Nunca debe ser acondicionado con disolventes polares tales como el Metanol porque pueden darnos resultados poco reproducibles.
- Se usa para separar compuestos que presenten en su molécula grupos funcionales que contengan dipolos, y la mayoría de compuestos que contengan heteroátomos así como también grupos con propiedades de resonancia como por ejemplo moléculas con anillos aromáticos [63].

4.2.1.1.3 Extracción en fase sólida para esteroides (EFS)

La extracción en fase sólida (EPS) como se mencionó con antelación es un método cromatográfico simple y económico que ha sido ampliamente utilizado en la preparación de diferentes clases de lípidos; asimismo se ha utilizado para extraer, purificar y diferenciar los esteroides libres de los insaponificables esto se logra gracias a la utilización de una fase móvil que son disolventes orgánicos con polaridad variada por ejemplo (hexano: acetato de etilo) el hexano que es un

solvente no polar y el acetato de etilo que tiene una polaridad intermedia, además se utiliza un fase estacionaria de silica gel 60 con un tamaño de partícula de 70-230 mesh, esta técnica consiste en utilizar cartuchos, los cuales son acondicionados previamente con la silica gel 60 y posteriormente se adiciona la mezcla de solventes (figura 3). Por otra parte, se ha demostrado que para separar fitoesteroles de algunos aceites vegetales ésta técnica presenta una mejor eficiencia y por lo tanto sería más conveniente que otras utilizadas para la separación de fitoesteroles, debido a que mejora la recuperación de las fracciones de los mismos [21].

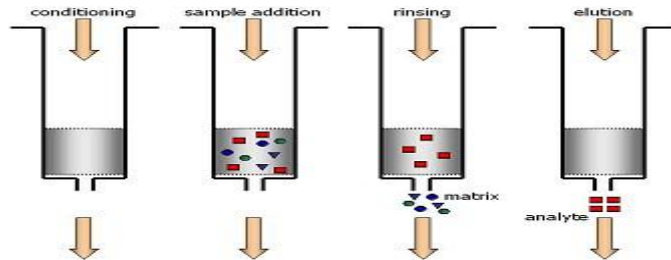


Figura 3. Cartuchos utilizados para la extracción en fase sólida (EFS)

La extracción en fase sólida (EFS) muestra una ventaja sobre cromatografía de columna (CC), ya que se puede hacer en poco tiempo, utiliza un pequeño volumen de disolvente, reduce el tiempo de exposición de la muestra al aire, y por lo tanto la formación de productos no deseables en el proceso de oxidación de esteroides [4].

4.2.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD)

La cromatografía de capa delgada (CCD) es un método útil para la separación y caracterización de componentes individuales de mezclas, dada la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases: una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil). La separación se logra por que algunas sustancias son más retenidas por la fase estacionaria, mientras que otras se desplazan mejor por la fase móvil [60].

En la cromatografía de capa delgada (CCD) se emplea como fase estacionaria una capa delgada de gel de sílica o alúmina adherida a un soporte, un disolvente (fase móvil) ascienda por capilaridad a través de la fase estacionaria, de modo que los componentes de la mezcla experimentan un proceso de adsorción-desorción, lo que provoca que unos avancen más rápidamente que otros [18].

4.2.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

La cromatografía de gases (CG) es un método físico de separación en que los componentes individuales de una mezcla gaseosa se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es la fase estacionaria mientras que la otra la fase móvil se mueve en una dirección definida. La muestra se vaporiza y es transportada por un

gas inerte (fase móvil) a través de la columna, la partición de la muestra ocurre en la fase estacionaria. Los componentes individuales de la muestra son separados entre sí, en función de las presiones de vapor y la afinidad con la fase estacionaria [24].

En la cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de la columna cromatográfica donde comienza la elución, la cual se produce por el flujo de una fase móvil gaseosa, que es un gas inerte, que la transporta a través de la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido (cromatografía gas-sólido), produciéndose entonces la retención de las moléculas de analito por adsorción; lo más habitual es que la fase estacionaria sea un líquido (cromatografía gas-líquido), en éste caso la fase estacionaria es un líquido no volátil inmovilizado sobre la superficie de un sólido inerte, donde los analitos se distribuyen entre las fases móvil y estacionaria, después de que los analitos son separados llegan al detector, el cual se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentren en forma gaseosa [19].

La cromatografía de gases por presentar una buena sensibilidad y obtener una buena separación, se emplea en el análisis de mezclas complejas como lo son derivados del petróleo, aceites, insecticidas, plaguicidas, pesticidas, ácidos grasos y esteroides. Igualmente la técnica de cromatografía de gases (GC) capilar incluye la reducción en los tiempos de análisis y las interferencias de pico, debido a la alta estabilidad térmica usada en columnas capilares polares que mejora la resolución de los componentes tipo esteroles [11], [12].

4.2.3.1 INSTRUMENTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

Un cromatógrafo de gases consta de sistema de suministro de fase móvil, sistema de inyección de muestra, columna cromatográfica situada en horno termostático y detector (figura 4).

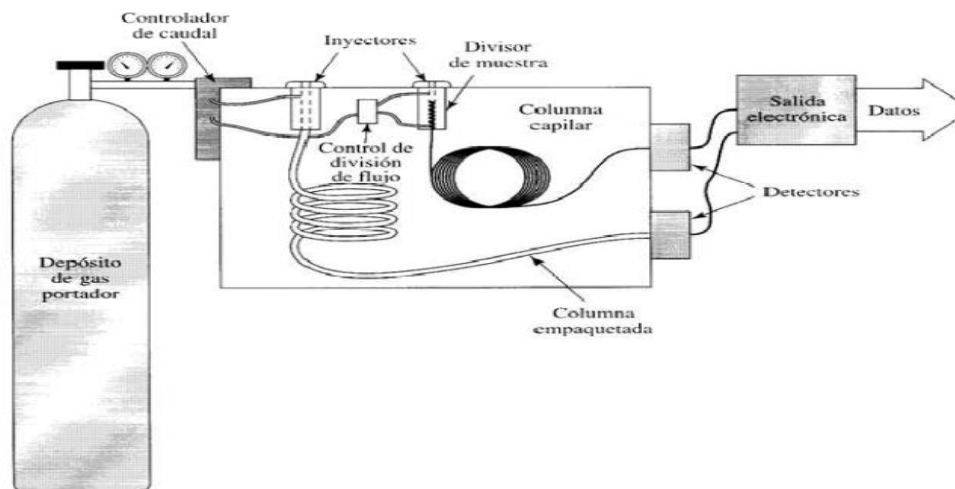


Figura 4. Esquema general de un cromatógrafo de gases.

4.2.3.1.1 Fase móvil (gas portador)

El propósito principal del gas portador es transportar los componentes volátiles a través de la columna es conocido como la fase móvil y debe ser químicamente inerte. Un segundo objetivo es proporcionar una matriz adecuada para el detector para favorecer las medidas de los componentes de la mezcla [24].

La selección del gas portador puede influir en la eficiencia de separación como en el tiempo de análisis, debido a que entre mayor sea el peso molecular del gas portador va a generar una mayor cantidad de platos teóricos [24]; los gases más utilizados son helio, nitrógeno y el hidrógeno. [24].

4.2.3.1.2 Sistema de inyección de muestra

El método más común de inyección de muestra implica el uso de una micro jeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un “septum” de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna (figura 5) (esta cámara normalmente está unos 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra) [24, 19].

Las técnicas de inyección más comunes en cromatografía de gases capilar son Split/Splitless utilizados, [24]. El modo de inyección Split es más simple, fácil, antiguo y comúnmente utilizado, este procedimiento implica la inyección de 1 μL de la muestra por una jeringa estándar en el puerto de inyección. La muestra se vaporiza rápidamente, y sólo una fracción, generalmente 1-2%, del vapor entra en la columna. El modo de inyección splitless, por su parte toma toda la muestra y la inyecta a través del puerto de inyección manejando cantidades de 1 a 5 μL . Este último modo lento pero es usado principalmente para mejorar la sensibilidad en análisis de trazas de muestras ambientales, farmacéuticas o biomédicas [24].

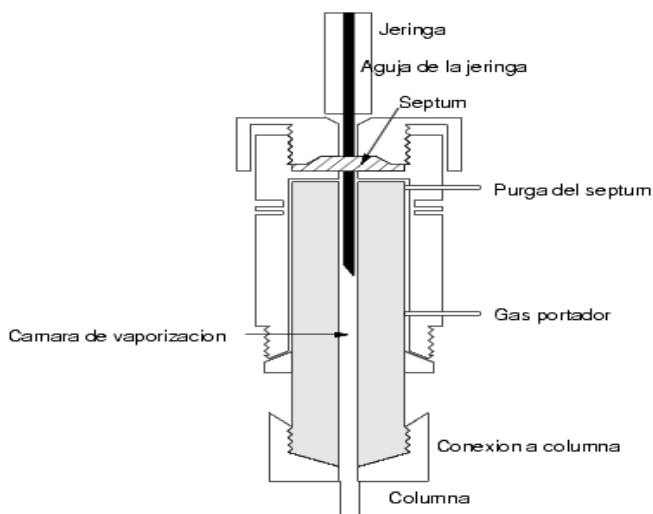


Figura 5. Sistema de inyección.

4.2.3.1.3 Columna cromatográfica.

En la cromatografía de gases se utilizan dos tipos de columnas, las columnas empaquetadas(o de relleno) y las capilares (o tubulares abiertas) siendo estas las más utilizadas las columna, [19].

- **Las columnas tubulares abiertas o capilares**, largas y estrechas, son fabricadas de sílice fundida (SiO_2) y recubiertas de poliamida (un plástico capaz de resistir temperaturas mayores a $350\text{ }^\circ\text{C}$. como soporte y protección contra la humedad atmosférica. Los diámetros de este tipos de columnas va de (0,1-0,53) mm, y las longitudes típicas va de 15 a 100m. Las columnas tubulares abiertas son de mayor resolución, permiten mayor rapidez de análisis, y mayor sensibilidad que las columnas empaquetadas aunque tiene menor capacidad de muestra [25].

4.2.3.1.3.1 Fase estacionaria

La fase estacionaria juega un papel decisivo en la cromatografía de gases, estas son en su mayoría líquidas como ya se ha comentado y deben cumplir una serie de requisitos como baja volatilidad: su temperatura de ebullición debe estar al menos 100 grados por encima de la temperatura máxima de trabajo, estabilidad térmica, deben ser estables a temperaturas elevadas y químicamente inerte

La característica más importante de la fase estacionaria es la polaridad puesto que ello define el reparto del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria permitiendo una adecuada separación en cromatografía de gases.

4.2.3.1.4 Detectores

El detector cromatográfico es el dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica que pondrá en manifiesto los aspectos cualitativos y cuantitativos de la concentración de la muestra analizada, los detectores deben de cumplir las características deseables como: adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, lineal en un intervalo amplio de concentración, amplio intervalo de temperatura de trabajo, tiempo de respuesta corto, no destructible con la muestra y Alta fiabilidad y manejo sencillo [19,24].

Los detectores más usados en la cromatografía de gases son Ionización de llama (FID), captura de electrones (ECD) y espectrómetro de masas (MS).

4.2.3.1.4.1 Detector de ionización de llama (FID)

El detector de ionización de llama (FID) consiste en que el efluente proveniente de la columna es quemado por una llama de oxi-hidrógeno produciendo iones, estos se recogen y forman una pequeña corriente que se convierte en una señal. Este detector de ionización de llama (FID) presenta una gran sensibilidad característica

(10^{-14} g/s). Un diseño típico del detector de ionización de llama (FID) se muestra en la figura 6.

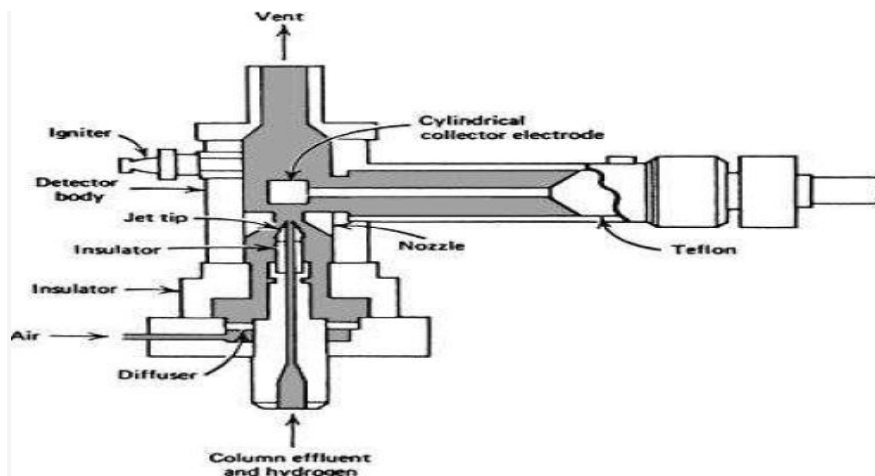


Figura 6. Detector ionización de llama.

El detector de ionización de llama (FID) responde a la gran mayoría de los compuestos orgánicos, los cuales se queman en la llama de oxi-hidrógeno produciendo una señal que es proporcional al contenido de átomos de carbono de cada compuesto analizado, dando lugar a la denominada regla del carbono, un factor de respuesta constante que se debe a la conversión de todos los átomos de carbono en metano en el proceso de combustión del FID, por ello, es más un detector sensible a la masa, que un sistema sensible a la concentración. Algunas ventajas del detector de ionización que presenta una buena sensibilidad (10^{-14} g/s), amplio intervalo lineal de respuesta (10^7), sencillez en su manejo, robustez, una excelente adaptabilidad a la mayoría de los tamaños de las columnas, además, este detector es insensible a los gases no combustibles, H_2O , CO_2 , SO_2 , N_2O , NO , NO_2 , NH_3 y bajo ruido de fondo. Una desventaja del detector es que se trata de un detector destructivo de la muestra [14, 24].

- **Espectrometría de Masas(EM)**

El espectrómetro de masas es capaz de detectar bajas concentraciones de analito, suministra información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los compuestos que eluyen de una columna, además, de que distinguen diferentes sustancias que tiene el mismo tiempo de retención [25].

Un espectrómetro de masa es un instrumento que produce iones y los separa de acuerdo con sus relaciones masa/carga, (m/z). Para lograr esto es necesario introducir una cantidad muy pequeña de muestra en la fuente de iones, donde los componentes se transforman en iones gaseosos gracias al bombardeo con electrones, fotones, iones o moléculas [14]. La salida de la fuente de iones es un

flujo de iones positivos o iones negativos gaseosos que son acelerados en el analizador de masas y separados en función de la relación masa/carga mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinado el tiempo de llegada a un detector. El haz de iones que llega al transductor se convierte en una señal eléctrica que es procesada y enviada a un ordenador. De ahí se obtiene los espectros de masas donde se presentan la abundancia iónica en función de la relación masa/carga de los iones detectados [14].

4.2.3.2 Análisis cualitativo

Un cromatograma proporciona sólo un elemento de información cualitativa a cerca de cada una de las especies de la muestra, a saber, su tiempo de retención.

La cromatografía de gases es un medio excelente para confirmar la presencia o ausencia de un supuesto componente en una mezcla, siempre que se disponga de un patrón. Tras la adición del compuesto conocido a la muestra, el cromatograma no debe presentar ningún pico nuevo, y debe observarse el aumento de algunos de los picos ya existentes. La prueba es particularmente convincente si el resultado se repite con columnas diferentes y a distintas temperaturas [14].

4.2.3.3 Análisis cuantitativo

En la cromatografía de gases los parámetros cuantitativos se basa en la comparación de la altura, o el área del pico del analito con la de uno de los patrones [14].

El uso, como parámetro del área del pico es más acertado cuando se requiere mayor exactitud en las determinaciones cuantitativas. Como se sabe, el área del pico es función de la cantidad de componente o de la concentración del mismo.

Para interpretar cuantitativamente el cromatograma se realizan curvas de calibración, que permitan conocer la relación real que, para cada componente, existe entre el área del pico y la cantidad de componente presente en una muestra, de forma que todos los picos, adecuadamente corregidos, sean comparables [14].

4.3 LUFFA CYLINDRICA

4.3.1 Descripción de la *luffa cylindrica*

El estropajo (*Luffa Cylindrica*) es una cucurbitácea ampliamente distribuida en las zonas tropicales del mundo, esto se debe principalmente a la variedad de usos que se le ha dado al fruto maduro figura 7, entre los que se encuentran esponjas y guantes para el aseo, confección de filtros para motores marinos, agua y líquidos (biosorción de iones de metales pesados) [10, 23], amortiguadores, asientos, empaques, suelas de zapatos entre muchos otros [27]; aplicaciones que se han venido desarrollando principalmente en países Europeos y Estados Unidos;

además el fruto puede cosecharse joven, siendo consumido cocido en preparaciones especiales en algunos países [46, 29].



Figura 7. Fruto madurado y semillas de *luffa cylindrica*.

Sin embargo la multiplicidad de sus usos no para allí, puesto que es usado en algunos países de Europa, China, Japón y Estados Unidos como ingrediente activo en preparaciones cosméticas como cremas para la piel emolientes e hidratantes [41,42], labiales [43], acondicionadores para el cabello [44, 45]. Debido a lo anterior existe una demanda de productos elaborados a partir de la *Luffa*, extendida a más de 35 países donde los principales importadores son Inglaterra, Holanda, España, Francia, Alemania e Italia [28].

4.4 LÍPIDOS

Los lípidos constituyen un grupo de biomoléculas estructuralmente muy heterogéneas, pero con características comunes de solubilidad; es decir, son poco o nada solubles en agua, pero solubles en disolvente orgánicos (éter, benceno, cloroformo entre otros). La mayor parte de los lípidos constituyen los aceites, grasas, las ceras, varias vitaminas y hormonas que suelen ser productos de reservas y protección en el ser vivo, algunos lípidos forman parte de las membranas biológicas, y de este modo participan activamente en muchos aspectos de la fisiología celular [30].

Las grasas animales y aceites vegetales son lípidos que se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza. Aunque parecen diferentes, las grasas animales como la mantequilla y la manteca son sólidos, mientras que los aceites vegetales como el aceite de maíz son líquidos, sus estructuras están estrechamente relacionadas. Químicamente, las grasas y los aceites son triglicéridos (figura 8), los cuales contienen tres ácidos carboxílicos de cadena larga llamados ácidos grasos y glicerol (figura 8). Los lípidos usualmente se clasifican en dos grupos, atendiendo a que posean en su composición ácidos grasos (lípidos saponificables) o no lo posean (lípidos insaponificables) [31].



Figura 8. Estructura de un triglicérido (glicerol y ácidos grasos)

4.4.1 Lípidos insaponificables

Son aquellos que no contiene ácidos grasos en su estructura, por ende no pueden formar jabones por la hidrólisis alcalina (saponificación), en este grupo se incluyen los componentes naturales insaponificables extraíbles con determinados solventes lipófilos, tales como esteroides, hidrocarburos, alcoholes, prostaglandinas, leucotrienos, terpenos [32].

4.5 ESTEROIDES

Los esteroides son lípidos insaponificables derivados de un núcleo fundamental formado por los tres anillos de un fenantreno hidrogenado y un ciclopentano; son, por lo tanto derivados de un cicloalcano tetracíclico conocido como el ciclopentanoperhidrofenantreno este se compone de carbono e hidrógeno formando 4 anillos fusionados, tres hexagonales y uno pentagonal, que poseen en total 17 átomos de carbono (figura 9) Los esteroides cumplen diferentes funciones como reguladores hormonales y estructurales [2, 33].

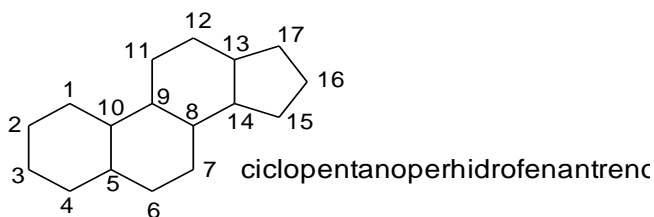


Figura 9. Estructura química ciclopentanoperhidrofenantreno.

Los esteroides son un grupo de productos naturales de gran interés por la gran variedad de sus compuestos, la importancia biológica de la mayor parte de ellos, sus actividades fisiológicas y sus aplicaciones farmacológicas. Forman parte de este grupo el colesterol, esteroides vegetales, ácidos biliares, las hormonas sexuales, las hormonas de la corteza suprarrenal o corticoides y cardiotónicos como las digitalinas, entre otros [2, 33].

4.5.1 Esteroles

Los esteroles son un grupo de sustancias naturales que contiene como núcleo ciclopentanofenantreno y presenta un grupo hidroxilo en el carbono 3. Estos compuestos contienen un total de 27 a 30 átomos de carbono (el número de átomos de carbono en el óxido de escualeno precursor biosintético) en el que una cadena lateral con átomos de carbonos mayores e iguales a 7 se adjunta en la posición de carbono 17. [2,34]

Las estructuras de los diferentes esteroles están relacionadas y varía dependiendo de la magnitud de las modificaciones del sistema de anillos y las variaciones de la cadena lateral. Así, el número y la posición de los dobles enlaces en ambos sistemas de la cadena policíclica del lado de los esteroles pueden ser diferentes (figura 10). Existen 2 tipos de esteroles, los de origen animal como por ejemplo el colesterol (figura 10), el colesterol está presente en las membranas celulares de los mamíferos en general, donde cumplen numerosas funciones [2].

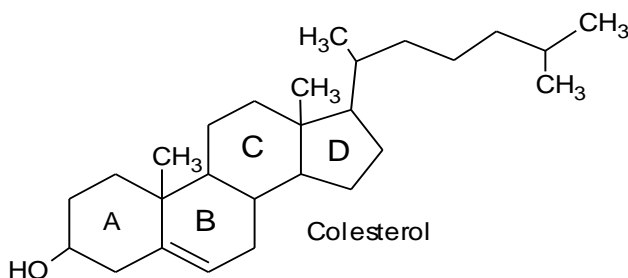


Figura 10. Estructura química de un esterol.

4.5.1.1 Fitoesteroles

Los fitoesteroles son esteroles de origen vegetal y son componentes estructurales importantes de las membranas de las plantas presentan una estructura química semejante al colesterol, poseen 28 o 29 carbonos y una larga cadena lateral de átomos de carbono) (figura 11). Los fitoesteroles a diferencia del colesterol, no son sintetizados o formados por el cuerpo humano y son escasamente absorbidos por el intestino [13].

Los fitoesteroles ampliamente en las plantas son el Campesterol, estigmasterol y sitosterol, [55]. Estos han adquirido gran importancia en los últimos años dada su capacidad antioxidante [36]; además de que inhiben la absorción intestinal del colesterol, por ello, su consumo se ha asociado con la disminución del riesgo de enfermedades del corazón; de igual forma poseen propiedades inmunomoduladoras que podrían ser benéficas para la prevención de cáncer de colon, cáncer de seno y daño tisular asociado a inflamación [35, 37].

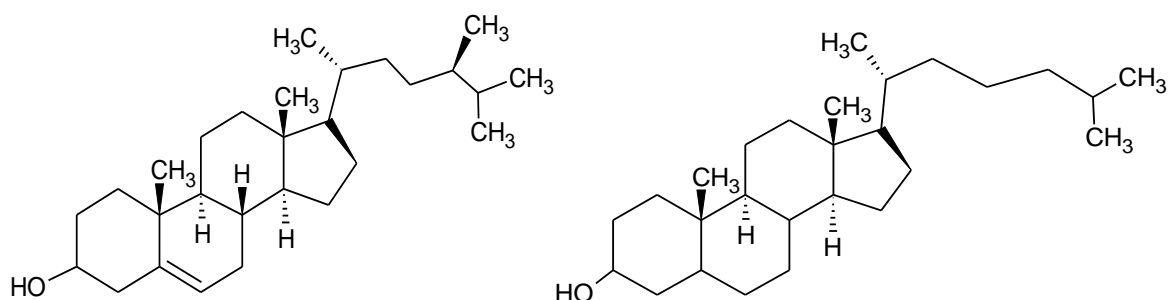


Figura 11. Moléculas de fitoesteros (Campesterol y dihidrocolesterol)

Diferentes organizaciones de seguridad alimentaria como la Food and Drug Administration (FDA) han propuesto diferentes regulaciones referentes a los esteroides vegetales, como aditivos para prevenir adulteraciones y evitar la adición excesiva a los alimentos como aceites, margarinas y lácteos que contribuyan con efectos negativos al organismo [38].

4.5.1.1.1 β - Sitoesterol

El β -sitosterol es un esteroide vegetal, relacionado estructuralmente con el colesterol, contiene un grupo β -etilo en el C-24 del esqueleto del colesterol (figura 12), lo que lo hace más lipofílico, está presente en bajas concentraciones en muchas frutas y verduras. Puede encontrarse en concentraciones mayores en *Nigella sativa*, cacahuetes, nueces, palma enana americana, aguacates, semillas de calabaza, soja, aceite de maíz, cáscara de arroz y germen de trigo, entre otros. Los esteroides vegetales se utilizan para reducir los niveles de colesterol en el suero y el beta-sitosterol, en concreto, se utiliza para tratar la hipertrofia prostática benigna [22].

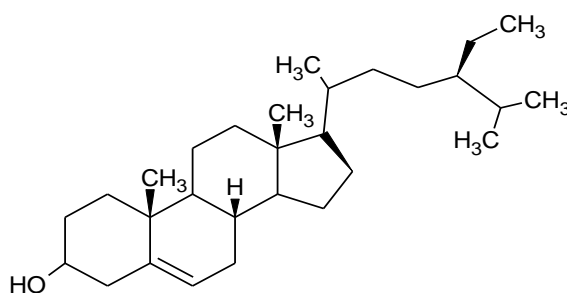


Figura 12. Molécula de β -Sitosterol.

4.5.1.1.2 Ergosterol

Es un esteroide vegetal, precursor biológico de la vitamina D₂. Se compone de cuatro anillos (el sistema ciclopentanoperhidrofenantreno, que comprende tres anillos condensados de 6 miembros y un anillo de 5 miembros) y una cadena lateral, un total de 28 átomos de carbono. Ergosterol se diferencia del colesterol, en el átomo de carbono adicional (grupo metilo) en la C-24 en la β -posición (en referencia a la

posición en el eje de la cadena lateral), así como otros enlaces dobles entre carbonos 7:8 y 22:23 (figura 13). Como la mayoría de los esteroides, el ergosterol también cuenta con 2 grupos metilo angulares en los carbonos 10 y 13 en la B-posición (perpendicular al plano del anillo). Tanto esteroides tienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 de la β -posición y sus productos de la per-oxidación han sido estudiados como componentes principales de extractos vegetales dada su contribución y potenciales beneficios para la salud e importantes propiedades farmacológicas entre las que se incluyen la reducción del dolor relacionado con la inflamación, reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares, actividades antimicrobianas, antiateroscleróticas, y antitumorales probadas en modelos animales y sistemas celulares [22, 75, 76, 77, 78].

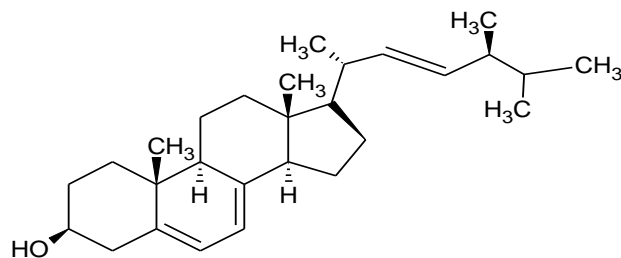


Figura 13. Molécula de Ergosterol.

4.5.1.1.3 Estigmasterol

El Estigmasterol es un esteroide vegetal (figura 14) insaturado que está presente en la planta de soja, frijol, semillas de calabaza, canola y en una serie de hierbas medicinales. El estigmasterol se encuentra en gran proporción en varios vegetales, legumbres, frutos secos [39].

Entre los usos más importantes del estigmasterol. Se usa como precursor de la vitamina D3. Investigaciones realizadas han indicado que el estigmasterol puede ser útil en la prevención de tipos de cáncer, incluyendo los ovarios, próstata, mama y colon [40, 56].

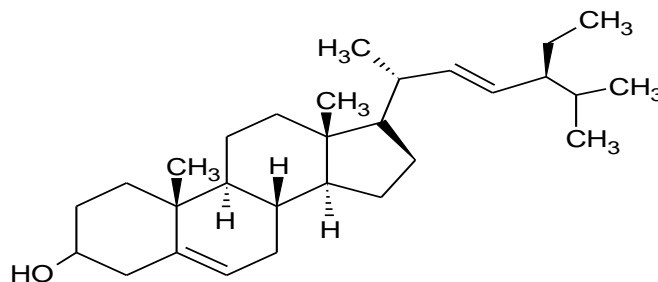


Figura 14. Molécula de estigmasterol.

4.6 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

4.6.1 Método soxhlet

Consiste en un medio de extracción sólido-líquido que se utiliza generalmente para extraer componentes lipídicos de una matriz, por medio de un solvente apolar figura 15.

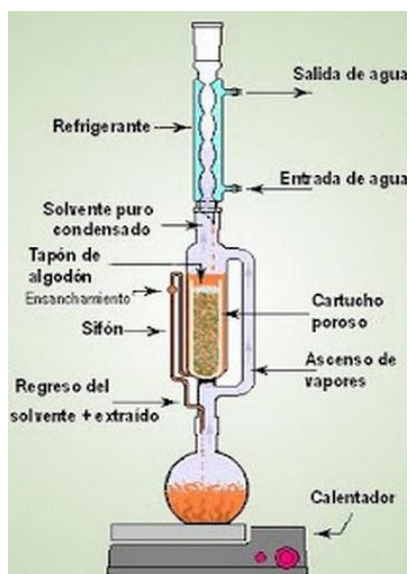


Figura 15. Extracción soxhlet

Las ventajas más importantes de la extracción son el contacto continuo de la muestra con la porción de disolvente, simplicidad, bajo coste de adquisición, posibilidad de procesar grandes cantidades de muestra, además de ser aplicable en alimentos en general. Dentro de las desventajas se encuentra la duración extensa en la extracción y cantidades grandes de disolvente lo que implica la necesidad de concentrar los extractos orgánicos obtenidos. [26, 57].

4.7 DERIVATIZACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA DE GASES

La derivatización en la cromatografía de gases se realiza para mejorar las características de detección del analito y algunas veces para proporcionar evidencia adicional de la identidad de un compuesto, además puede ser utilizada para acortar o alargar el tiempo de retención y para permitir la separación de moléculas que tengan enantiomerismo.

Al momento de elegir el reactivo derivatizante y por tanto las condiciones de reacción se basará principalmente en el grupo funcional de la molécula y la presencia de otros grupos funcionales o lábiles en la molécula. Por lo general, hay tres tipos de reacciones de derivatización, sililación, acilación y alquilación. En

cromatografía de gases (CG) la sililación es la reacción más utilizada debido a que reduce tiempo de retención mientras que la acilación genera lo contrario [58].

4.7.1 Derivatización de esteroides

Los compuestos esteroidales contiene grupo funcional polar como el grupo hidroxilo (-OH), estos sin someterlos a un proceso previo de derivatización dan colas ineficientes en los picos de cromatografía de gases (CG), dando lugar a poca selectividad y sensibilidad. A través de la derivatización la sensibilidad y la detección de los esteroides se incrementa debido a que los derivados de los esteroides son menos polares y más volátiles presentando un mayor estabilidad térmica; las reacciones más importantes para los esteroides y otros compuestos que necesiten previa derivatización son la sililación y la acilación [64].

En las reacciones de sililación para los esteroides consiste en que el hidrogeno lábil del grupo hidroxilo del anillo A en el carbono 3, es sustituido por el grupo de trimetilsililo. La reacción se produce a través de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) (figura 16). Los productos de la reacción son generalmente más volátiles y térmicamente estables. La sililación utiliza reactivos como trimetilsilil (TMS), N, O-bis (trimetilsilil) acetamida (BSA), N-metil-N- (trimetilsilil) - trifluoroacetamida (MSTFA), trimetilsililimidazol (TMSI) bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y el N-metil-N-terc-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA) por lo cual los dos últimos son más utilizados en las derivatización de los compuestos fenólicos, esteroides y azúcares [65].

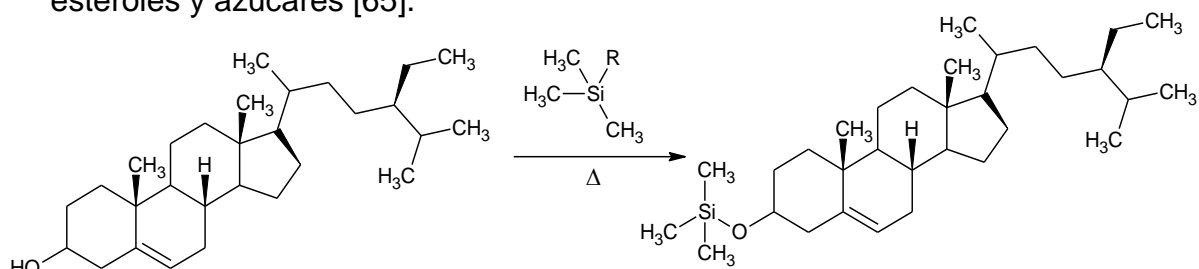


Figura 16. Reacción de derivatización a un esteroil

Además de la sililación se utiliza también reacciones de acilación, en las cuales el hidrogeno lábil del grupo hidroxilo de los esteroides se transforman en ésteres, tioésteres y amidas estas se realizan con reactivos como cloruro pentafluorobenzoyl y con anhídrido heptafluorobutirico, este tipo de reacciones no es recomendada para el análisis de esteroides debido a que estos reactivos producen subproductos que al ser inyectados sin previa purificación pueden que eluyan a tiempos de retención similar a la del compuesto de interés provocando errores en la medición [65].

5. METODOLOGÍA

5.1 ESTÁNDARES DE FITOESTEROLES

Se empleó una mezcla preparada a partir de cuatro estándares de fitoesteroles, la mezcla presentaba una concentración diferente para cada fitoesterol (5- α Colestano 100 ppm, Colestanol y estigmasterol 133,55 ppm y ergosterol 233,5 ppm). Los estándares utilizados son de marca SUPELCO.

5.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Se realizaron siete corridas con los estándares de fitoesteroles, logrando establecer las siguientes condiciones de operación para el análisis de fitoesteroles tabla 1.

CROMATÓGRAFO DE GASES SHIMADZU GC-2014		
Parte	Especificación	Condición
Autoinyector	-	AOC-20i+s
Automuestreador	-	AOC-20s
Fase móvil	Gas transportador	Helio
	Flujo total	45 mL/min
	Flujo en columna	4 mL/min
	Velocidad lineal	74 cm/s
Inyector	Temperatura	350 °C
	Volumen	1 μ L
	Modo	Split
	Radio split	10
Columna MXT5	Serie	508529G1
	Longitud	30 m
	Diámetro interno	0,25 mm
	Espesor de película	0,5 μ m
	Temperatura 1	250
	Tiempo de calentamiento 1	2 min
	Rata	40
	Temperatura 2	280
Tiempo de calentamiento2	17	
Detector	Tipo	FID
	Temperatura	310 °C

Tabla 1. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases para el análisis de estándares de fitoesteroles.

En la figura 17 se presenta la imagen del equipo de cromatografía de gases utilizado para la estandarización.



Figura 17. Cromatógrafo de gases marca Shimadzu GC-2014.

5.2.1 NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE FITOESTEROLES

Con la mezcla de los estándares de fitoesteroles, se hicieron varias diluciones para obtener patrones que cubran las concentraciones de los fitoesteroles tomando como referencia su respuesta en el equipo; se establecieron seis niveles de concentración para cada estándar como se observa en la tabla 2.

Estándar	Niveles					
	1	2	3	4	5	6
5 α Colestano (ppm)	2,10	4,20	8,40	12,0	32,0	60,0
Colestanol (ppm)	3,15	6,30	12,6	18,0	48,0	90,0
Ergosterol (ppm)	5,25	10,5	21,0	30,0	80,0	150,0
Estigmasterol (ppm)	3,15	6,30	12,6	18,0	48,0	90,0

Tabla 2. Niveles de concentración de los fitoesteroles.

5.2.2 CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE FITOESTEROLES

Una vez preparados los patrones externos, se inyectaron cinco veces al cromatógrafo de gases siguiendo el método cromatográfico previamente

establecido. Se realizó una curva de calibración para cada estándar de fitoesterol con los seis niveles de concentración, para así determinar los parámetros para la estandarización, siguiendo las metodologías de algunas investigaciones previas y la normativa de la Association of Official Analytical Chemist, (AOAC).

5.2.2.1 PRECISIÓN

Para la determinación de la precisión se realizó en función de:

Repetibilidad: Se evaluó por medio de 3 réplicas de cada estándar de diferentes concentraciones, con los cuales se calculó: promedio \bar{X} , desviación estándar S y coeficiente de variación C_V [15].

Reproducibilidad: se evaluó por triplicado, referente al cambio de vial para cada uno se calculó: promedio (\bar{X}), desviación estándar (s), y el coeficiente de variación (C_V) [15].

5.2.2.2 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para la determinación del límite de detección y cuantificación, se empleó el método basado en la extrapolación de la recta calibrado a concentración cero, el cual es un procedimiento aplicable a métodos analíticos instrumentales [15].

5.2.2.3 SENSIBILIDAD

Se determinó mediante la pendiente de la curva de calibración para cada estándar de fitoesteroides [14].

5.2.2.4 LINEALIDAD

Se determinó a partir de los patrones externos preparados en el apartado 5.2.2, se elaboró la curva de calibración de cada uno de los estándares, se obtuvo la ecuación de la recta $y = m x + b$, con el fin de examinar la correlación entre ellos (r^2) [14].

5.2.2.5 EXACTITUD

Para calcular la exactitud se prepararon por triplicado tres niveles de concentración diferentes. Con los datos obtenidos se calculó por medio del porcentaje de error [14, 15].

5.3 ANÁLISIS DE LA MUESTRA REAL (SEMILLAS DE *LUFFA CYLINDRICA*)

Como muestra de análisis se utilizó semillas de *luffa cylindrica* frescas, obtenidas del municipio de Marsella en el departamento de Risaralda, Colombia (figura18).



Figura 18. Ubicación del municipio de Marsella en el departamento de Risaralda, Colombia.

(FUENTE: Alcaldía de Marsella, Risaralda.)

5.4 TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LAS SEMILLAS DE *LUFFA CYLINDRICA*

Las semillas de *luffa cylindrica* se lavaron con jabón tigo 51, para alimentos y se secaron durante dos días a 45 °C en estufa BINDER, una vez secas las semillas fueron molidas en un molino de cuchillas eléctrico Continental Electric (figura 19).



Figura 19. Semillas de *luffa cylindrica*

5.5 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLAS DE *LUFFA CYLINDRICA*

La extracción del aceite de semillas de *luffa cylindrica*, se realizó por el método soxhlet, utilizando como solvente n-hexano en una relación muestra: solvente (1:5), por un periodo de dos horas, con base en estudios previos [7]. El extracto

orgánico, se concentró por rotaevaporación y el aceite obtenido se almacenó en un recipiente ámbar a una temperatura de 4 °C, para su posterior saponificación.

5.6 EXTRACCIÓN DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE

La saponificación del aceite de semillas de *luffa cylindrica* y la obtención de su materia insaponificable, se realizó por triplicado según la norma ICONTEC NTC 235-2 [79].

5.7 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA OBTENCIÓN DE FRACCIÓN DE FITOESTEROLES

Se evaluó la técnica de extracción en fase sólida, para la obtención de la fracción de fitoesteroles desde la materia insaponificable, la cual se efectuó con cartuchos de sílica gel (fase normal) con capacidad de 3mL/ 500 mg marca RESTEK referencia (24035), en una relación sílica muestra (0,5g: 0,025g), con base en estudios previos [7]. Se acondicionó la columna con 4 mL de *n*-hexano hasta sequedad con aire y finalmente se aplicó la muestra.

Se tomaron dos sistemas de elución (tabla 3) con base a estudios previos, [7]. Las fracciones obtenidas se evaluaron por cromatografía de capa delgada.

Fracción	Sistema 1	
	Relación	Volumen (mL)
F1	Hexano: Acetato de Etilo 9:1	3,5
F2	Acetato de etilo	3,5
Volumen De elución		7

Fracción	Sistema 2	
	Relación	Volumen (mL)
F3	Hexano: Diclorometano 9:1	7
F4	Diclorometano	8
Volumen De elución		15

Tabla 3. Sistemas de elución para fitoesteroles.

5.8 CARACTERIZACIÓN PREVIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD)

Las fracciones obtenidas a partir de la extracción en fase sólida, se evaluaron por cromatografía en capa delgada (CCD), mediante el uso de cromatofolios de CCD de sílica gel 60 F254 como fase estacionaria de 5.2 x 2.5 cm. La caracterización se hizo empleando como fase móvil hexano: éter etílico: ácido acético (8: 2: 0.1).

Cada fracción se analizó por triplicado; utilizando como reveladores vapores de yodo y ácido fosfomolibdico preparado al 10% en etanol absoluto [7, 59].

5.9 DERIVATIZACIÓN DE LAS FRACCIONES DE FITOESTEROLES

Una vez se caracterizaron las fracciones obtenidas en el numeral 5.8, cada una de ellas se sometió a derivatización con una solución derivatizante SILYL-991 (BSTFA + 1% TMCS) se agitaron por 30 segundos y se colocaron en un baño de agua a 70°C por 30 minutos. [12, 61,62].

5.10 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA MUESTRA DE *LUFFA CYLINDRICA*.

Después de que la técnica fue estandarizada, se realizó el análisis cromatográfico de la muestra real a las condiciones establecidas para el análisis de los estándares.

5.10.1 Análisis cualitativo

El análisis cualitativo se realizó a través de la comparación de los tiempos de retención de los estándares con los existentes en el cromatograma de la muestra real.

5.10.2 Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo se realizó por medio de las curvas de calibración realizadas a cada estándar y su respectiva ecuación de la recta de calibrado, con lo cual se determino la concentración del estero vegetal presente en la muestra.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS ESTÁNDARES

Para el análisis cromatográfico se corrieron individualmente los cinco estándares de fitoesteroles, para conocer el orden de elución y tiempos de retención de cada uno ellos, se realizó un coctel con los estándares y se inyectó al cromatógrafo, siendo incompatible el β -Sitoesterol debido a que presentaba interferencias que afectaban la mezcla de los otros estándares, por lo cual se procedió a analizar de forma individual dicho estándar. En la figura 20 se pueden observar los cromatogramas de la mezcla de los estándares y el cromatograma del β -sitoesterol.

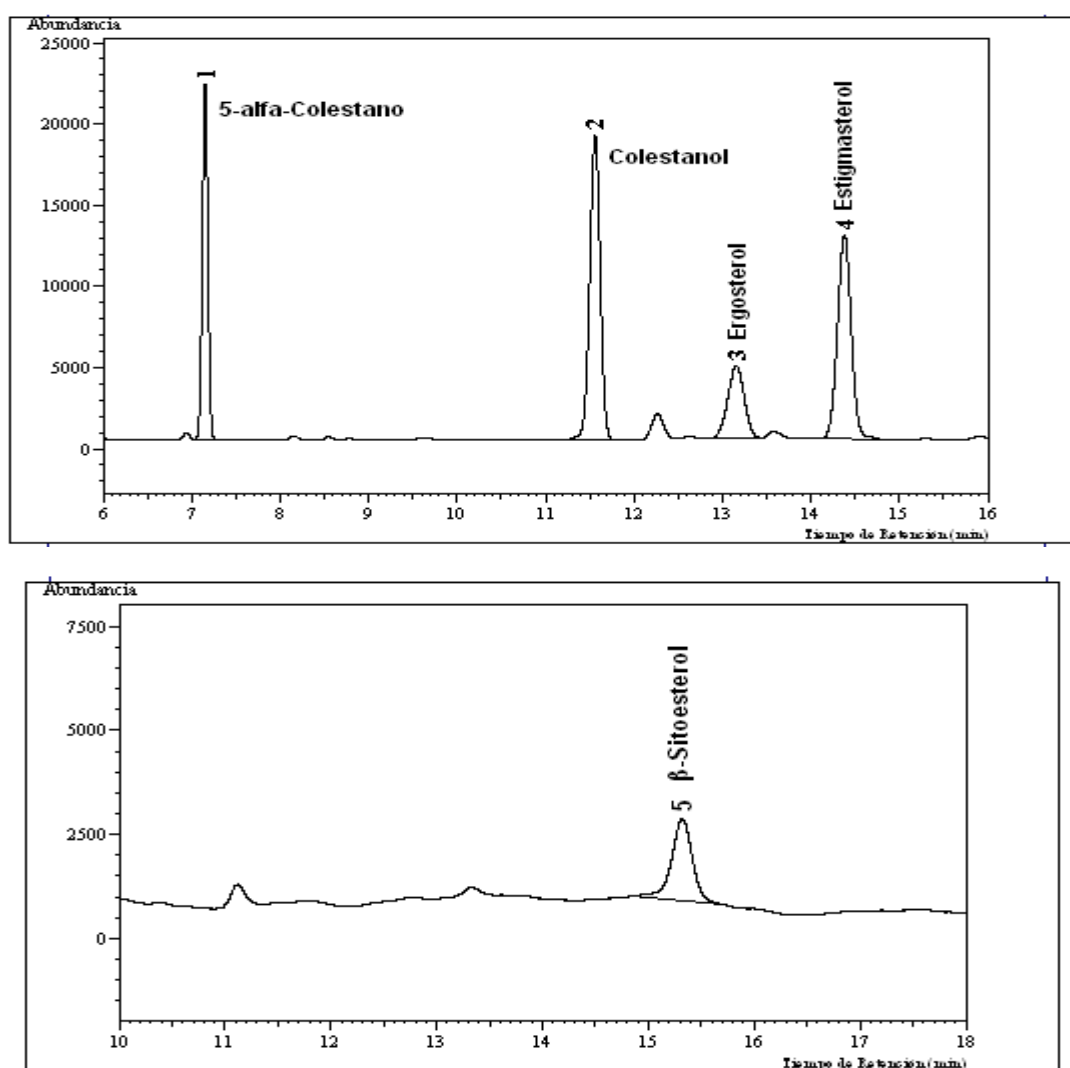


Figura 20. Cromatogramas de los estándares de fitoesteroles

En los cromatogramas se puede apreciar que los picos tienen una adecuada resolución puesto que están bien definidos, existe una buena separación al notarse el principio y el final de cada uno, lo cual también demuestra que no existió superposición entre los diferentes estándares.

En la tabla 4, se presenta el nombre de cada fitoesterol con su respectivo tiempo de retención y área.

PICO	NOMBRE	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	ÁREA
1	5 α Colestano	7,163	50992
2	Colestanol	11,557	82991
3	Ergosterol	13,180	32237
4	Estigmasterol	14,398	73186
5	β -sitoesterol	15,890	8976,4

Tabla 4. Tiempos de retención y área de cada uno de los estándares de fitoesteroles.

6.2 CURVA DE CALIBRACIÓN DEL COCTEL CON LOS ESTÁNDARES DE FITOESTEROLES

Para cada nivel de concentración se determinó la media, desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar relativa así:

- **Media:**

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Donde:

\bar{X} : Media aritmética o poblacional

X_i : Valor medido en el ensayo i

n: numero de medidas realizadas

- **Desviación estándar**

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

SD: desviación estándar

X_i : Valor medido en el ensayo i

\bar{X} : Media aritmética o poblacional

n: numero de medidas realizadas

• **Coefficiente de variación estándar**

$$\%C_v = \frac{SD}{\bar{X}} * 100$$

Donde:

C_v = Coeficiente de variación estándar.

SD= Deviación estándar

\bar{X} : Media aritmética o poblacional

En la tabla 5, se presentan los datos promedio correspondientes a las áreas y concentración de los patrones de cada estándar para elaborar las curvas de calibración, así como también los valores de coeficiente de variación estándar (C_v).

En el anexo 1 se encuentran las áreas obtenidas para el triplicado de cada uno de los niveles de concentración de los fitoesteroles del coctel.

PROMEDIO AREA \pm C_v (n=3)							
5 α Colestano		Colestanol		Ergosterol		Estigmasterol	
mg/L	área	mg/L	Área	mg/L	Área	mg/L	Área
2,1	1844 \pm 0,73	3,15	2602 \pm 0,94	5,25	932 \pm 0,34	3,15	2245 \pm 1,08
4,2	3843 \pm 1,13	6,30	5559 \pm 0,21	10,5	2173 \pm 0,98	6,30	4771 \pm 0,69
8,4	7603 \pm 0,18	12,6	10290 \pm 1,40	21,0	4325 \pm 1,10	12,6	8933 \pm 0,76
12	11093 \pm 0,42	18,0	16489 \pm 1,23	30,0	6123 \pm 1,29	18,0	14279 \pm 0,46
32	27358 \pm 0,83	48,0	41351 \pm 0,66	80,0	16468 \pm 0,51	48,0	37005 \pm 0,79
60	50015 \pm 0,29	90,0	80913 \pm 0,18	150,0	30890 \pm 0,51	90,0	69088 \pm 0,18

Tabla 5. Datos de las áreas obtenidas de cada uno de los patrones de fitoesteroles para la elaboración de las curva de calibración

Con el promedio de las áreas y la concentración, se realizó una curva de calibración para los estándares del coctel obteniéndose la ecuación de la línea recta. En la figura 21, se presenta la curva de calibración para el 5 α Colestano, las demás curvas se presentan en el anexo 2.

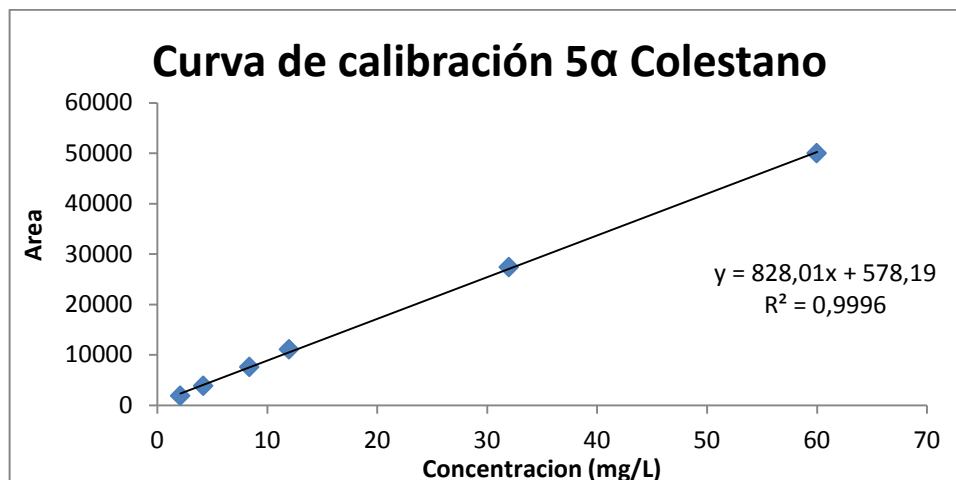


Figura 21. Curva de calibración para el 5α Colestano

Como se puede observar en la tabla 5, los valores (C_v) son menores al 2% en los niveles de concentración, lo que indica que el método tiene una buena reproducibilidad y ofrece resultados confiables.

En la tabla 6, se presentan las áreas de cada patrón medidas por el equipo al inyectarse cada uno de ellos para el cálculo de la repetibilidad, así como también los valores de coeficiente de variación estándar (C_v).

En el anexo 3, se encuentran las áreas obtenidas para las réplicas de cada uno de los niveles de concentración diferentes de los constituyentes de coctel de estándares.

PROMEDIO AREA ± C_v (n=3)							
5α Colestano		Colestanol		Ergosterol		Estigmasterol	
mg/L	Área	mg/L	Área	mg/L	Área	mg/L	Área
2,1	1952 ± 0,68	3,15	2726 ± 0,46	5,25	1061 ± 0,77	3,15	2434 ± 0,71
8,4	7560 ± 0,42	12,6	10587 ± 0,89	21,0	4401 ± 0,70	12,6	8843 ± 0,38
32	28818 ± 0,38	48,0	44607 ± 0,90	80,0	17809 ± 0,25	48,0	39698 ± 0,37

Tabla 6. Datos de las áreas obtenidas de cada uno de los patrones de fitoesteroles para el cálculo de la repetibilidad

Según la tabla 6, los valores de coeficiente de variación estándar (C_v) son inferiores al 2% en los tres niveles de concentración estudiados, lo que indica una buena repetibilidad del método.

Se han realizado diferentes investigaciones en diversas matrices, que incluye un análisis cromatográfico de fitoesteroles, como por ejemplo en plasma, granos, vegetales crudos y cocidos, tabaco, en la mayoría de los casos se presentaron coeficientes de variación estándar oscilantes entre 0.7 – 29.9% [70]. Para los

fitosteroles analizados en este estudio la desviación estándar estuvo entre 0.2 y 1.5%, lo cual indica que la estandarización es adecuada y permite una buena cuantificación de los analitos de interés, dada la buena reproducibilidad y repetibilidad de los datos.

6.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para cada curva de calibración correspondiente, se calcularon los parámetros estadísticos necesarios para la estandarización del método como son:

- Coeficiente de variación estándar (C_v)
- La desviación estándar (SD)
- Coeficiente de correlación (R^2)
- Límite de detección (LD)
- Límite de cuantificación (LC)
- Sensibilidad
- Sesgo
- Exactitud
- Precisión

El software que maneja el equipo el GC-solution 2014 proporcionó los valores correspondientes a R^2 , SD y C_v .

6.3.1 CÁLCULO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de cada curva de calibración empleándose el método basado en la extrapolación de la recta calibrado a concentración cero [15].

$$(LD) = \frac{Y_{bl} + (3 * S_{bl})}{b * \sqrt{n}} \quad (LC) = \frac{Y_{bl} + (10 * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

Los valores de límites de detección y cuantificación, para cada uno de los estándares de fitosteroles se pueden observar en la tabla 7.

Nombre	R	R ²	SD (Área)	C _v	LD (ppm)	LC (ppm)	SENSIBILIDAD (ppm/área)
Colestano	0,9998	0,9996	34,14	3,85	0,0488	0,1094	828,01
Colestanol	0,9996	0,9993	37,91	4,37	0,2566	0,4593	897,2
Ergosterol	0,9999	0,9999	9,56	4,72	0,4696	0,6586	206,4
Éstigmasterol	0,9999	0,9999	32,12	4,27	0,1523	0,1927	770,5

Tabla 7. Resultados estadísticos obtenidos para las curva de calibración.

Los límites de detección (LD) obtenidos se encuentran en un rango de 0,0488 y 0,4696; los límites de cuantificación (LC) entre 0,1094 y 0,6586, estos valores son buenos, ya que los esteroides vegetales constituyen la mayor porción de la materia insaponificable de los aceites vegetales, por lo anterior las concentraciones de los fitoesteroides son altas; al comparar estos parámetros con otros métodos evaluados previamente por otros autores, límites de detección (colestanol 0,40 ppm, ergosterol 0,35 ppm y el estigmasterol 0,11 ppm) [11] y límite de cuantificación (colestanol de 1,30 ppm, para el Ergosterol de 1,2 ppm y para el Estigmasterol de 0,2 ppm) [66, 67], se encontró que los valores experimentales son más sensibles a los reportados por la literatura científica, por tanto el método tiene la capacidad de detectar y cuantificar fitoesteroides a muy bajas concentraciones en matrices oleosas.

6.3.2 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LINEAL

Los coeficientes de correlación lineal presentados en la tabla 7 para cada curva de calibración; mostraron una linealidad adecuada debido a que los valores de R^2 son muy cercanos a la unidad, al comparar con estudios previos, los valores de R^2 fueron inferiores (Para el Colestanol un valor de 0,9998, Estigmasterol de 0,9993 y para el ergosterol de 0,9984) [11,66], por lo tanto se concluye que los valores obtenidos de coeficiente de correlación, son buenos e indican que las curvas de calibración son confiables para realizar análisis de este tipo de fitoesteroides. Para confirmar la linealidad del método se realizó el test estadístico de test student:

- **Distribución t de student**

Para determinar este indicador se plantearon dos hipótesis y estas se sometieron a prueba. En este caso las hipótesis fueron:

Hipótesis nula (H_0): No existe correlación significativa entre las variables.

Hipótesis alternativa (H_1): Existe correlación significativa entre las variables.

Para el desarrollo del test se calcula t_r con $n-2$ grados de libertad para un nivel de confianza del 99% (probabilidad $p=0,01$) siendo n el número de niveles de concentración analizados y se compara con el valor $t_{crítico}$ que corresponde al t tabulado [17].

El valor de t_r se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}}$$

Para un nivel de confianza del 99%, $n=6-2=4$ grados de libertad, se tiene $t_{crítico}=4,60$, en el anexo 4 se presentan los valores de t para diferentes niveles de confianza.

En tanto que si $t > t_c$ se rechaza la hipótesis nula.

Compuesto	R	r^2	t	t_c	H_0	Correlación lineal
Colestano	0,9997829	0,9995658	67,86	4,60	Rechazada	Existe correlación lineal
Colestanol	0,9996602	0,9993204	54,24	4,60	Rechazada	Existe correlación lineal
Ergosterol	0,9999883	0,9999766	292,35	4,60	Rechazada	Existe correlación lineal
Estigmasterol	0,9998881	0,9997761	94,51	4,60	Rechazada	Existe correlación lineal

Tabla 8. Resultados estadísticos obtenidos para el test de linealidad.

Como se muestra en la tabla 8, la hipótesis nula es falsa, por que el valor de t es mucho mayor al valor de t_c , para los 4 grados de libertad en un nivel de confianza del 99%, por lo tanto la hipótesis alternativa se da por verdadera debido a que existe una buena correlación lineal entre las variables, lo que indica que en general todas las curvas de calibración correlacionan en concentración y respuesta del equipo de forma lineal.

6.3.3 Precisión

La precisión del método, la cual es expresada matemáticamente por medio del coeficiente de variación (C_v) y según la tabla 7 indica que los valores de C_v fueron menores al 5%, por lo que se concluye que el método presenta una precisión adecuada y es reproducible.

6.3.4 Sensibilidad

El valor de sensibilidad esta asociado al valor de la pendiente de las curvas de calibración, como se muestra en la tabla 7, los valores de sensibilidad fueron buenos debido a mayor pendiente mejor la sensibilidad del método, lo que indica que permite detectar los mínimos cambios de concentración del analito en las muestras.

6.3.5 Sesgo

El sesgo se cálculo al aplicando la formula, $Sesgo = \mu - x_t$ donde μ corresponde al valor promedio de concentración de cada nivel y x_t es el valor esperada para cada nivel de concentración. En la tabla 9, se presentan los datos obtenidos para el cálculo del sesgo experimental.

Estándar	concentración real (ppm)	Concentración experimental (ppm)			Promedio (ppm)	Sesgo
Colestano	4,2	4,23	4,19	4,21	4,21	0,01
	12,0	12,12	12,23	12,10	12,15	0,15
	60,0	59,88	60,01	59,69	59,86	-0,14
Colestanol	6,3	6,26	6,28	6,19	6,24	-0,06
	18,0	18,37	18,40	18,31	18,36	0,36
	90,0	90,75	91,61	90,74	91,03	1,03
Ergosterol	10,5	10,45	10,91	10,29	10,55	0,05
	30,0	30,13	29,49	31,91	30,51	0,51
	150,0	150,61	152,71	150,08	151,13	1,13
Estigmasterol	6,3	6,25	6,35	6,36	6,32	0,02
	18,0	18,23	18,40	18,42	18,35	0,35
	90,0	90,03	92,75	89,80	90,86	0,86

Tabla 9. Resultados estadísticos obtenidos para el cálculo de sesgo experimental.

Según la tabla 9, se puede decir que las medidas no presentan un sesgo significativo debido a que las medidas experimentales de concentración se acercan a las reales, por ende serían medidas bien centradas, sin embargo, para confirmar esto se procede a realizar una prueba del sesgo, la cual consiste en comparar la diferencia experimental obtenida con la diferencia $\mu - x_t$ que cabría esperar para un nivel de probabilidad o confianza dado.

Este test de detección del sesgo utiliza el parámetro estadístico “t” valor de intervalos de confianza y se obtiene la siguiente ecuación:

$$(1) \text{ Sesgo} = \mu - x_t = \pm \frac{t \cdot SD}{\sqrt{N}}$$

Donde t corresponde a los valores de intervalos de confianza, SD: corresponde a la desviación estándar de las medidas realizadas y N: número de medidas replicadas. La presencia de un sesgo en el método viene indicada cuando la diferencia experimental es mayor que el valor calculado, a partir de la ecuación anterior. Por el contrario, si el valor calculado a partir de la ecuación es más grande, no queda demostrada la presencia de un sesgo [14].

Para un nivel de confianza del 99 % y para 2 grados de libertad, se obtiene que el valor de t es de 9,92 (anexo 4) y para un número de tres medidas, se obtuvieron los siguientes resultados en la tabla 10.

Estándar	Concentración experimental (ppm)			SD	Sesgo de ecuación	Sesgo experimental
Colestano	4,23	4,19	4,21	0,0228	0,131	0,01
	12,12	12,23	12,10	0,1150	0,659	0,15
	59,88	60,01	59,69	0,0723	0,414	-0,14
Colestanol	6,26	6,28	6,19	0,0193	0,110	-0,06
	18,37	18,40	18,31	0,2228	1,276	0,36
	90,75	91,61	90,74	0,8056	4,614	1,03
Ergosterol	10,45	10,91	10,29	0,2524	1,446	0,05
	30,13	29,49	31,91	0,3383	1,937	0,51
	150,61	152,71	150,08	1,4216	8,142	1,13
Estigmasterol	6,25	6,35	6,36	0,0500	0,286	0,02
	18,23	18,40	18,42	0,2007	1,150	0,35
	90,03	92,75	89,80	1,5791	9,044	0,86

Tabla 10. Datos obtenidos para el cálculo del test de sesgo.

De acuerdo a la tabla 10, los valores del sesgo calculados a partir de la ecuación (1) son mayores a los obtenidos experimentalmente, por lo que se puede decir que no existe un sesgo en el método analítico.

6.3.6 Exactitud

La exactitud se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{|\text{dato experimental} - \text{dato real}|}{\text{dato real}} * 100$$

En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos para el cálculo de la exactitud

Estándar	concentración real (ppm)	Concentración experimental (ppm)			Promedio (ppm)	%Error
Colestano	4,2	4,23	4,19	4,21	4,21	0,24
	12,0	12,12	12,23	12,10	12,15	1,30
	60,0	59,88	60,01	59,69	59,86	0,23
Colestanol	6,3	6,26	6,28	6,19	6,24	0,95
	18,0	18,37	18,40	18,31	18,36	2,00
	90,0	90,75	91,61	90,74	91,03	1,10
Ergosterol	10,5	10,45	10,91	10,29	10,55	0,48
	30,0	30,13	29,49	31,91	30,51	1,70
	150,0	150,61	152,71	150,08	151,13	0,75
Estigmasterol	6,3	6,25	6,35	6,36	6,32	0,32
	18,0	18,23	18,40	18,42	18,35	1,90
	90,0	90,03	92,75	89,80	90,86	0,96

Tabla 11. Resultados estadísticos obtenidos para el cálculo de exactitud.

Como se aprecia en la tabla 11, los porcentajes de error entre los valores reales y experimentales fueron menores al 5%, lo que indica que la exactitud del método es buena, por consiguiente los valores experimentales son muy próximos a los reales.

6.4 ANÁLISIS DE LA MUESTRA REAL (ACEITE DE SEMILLAS DE *LUFFA CYLINDRICA*)

El aceite de semillas de *luffa cylindrica* obtenido presentó una tonalidad verde oscura (figura 22) y un porcentaje de rendimiento de extracción del 8,45%, el cual fue menor en comparación con los obtenidos por extracciones anteriores (15.7% y 17.8%) esto último puede deberse a diversos factores entre los que se encuentra:

Las diferencias en composición de los suelos que existen de un cultivo a otro y de un lugar a otro que son decisivas en la calidad y la cantidad de compuestos en presentes en una planta.

Las condiciones ambientales de la región de Combia en comparación con la temperatura de Marsella no es sustancialmente diferente sin embargo, se conoce que el clima propio para el desarrollo de esta planta es tropical, por tanto es mucho mejor para el desarrollo de la planta el clima de Combia.

En el tratamiento de la muestra de semilla de *luffa cylindrica*, se desconoce la forma del secado de las semillas en cuanto a tiempo lugar y exposición al sol, mientras que el secado que se le realizó a las semillas en este estudio se hizo en horno a temperatura controlada y en un tiempo específico.

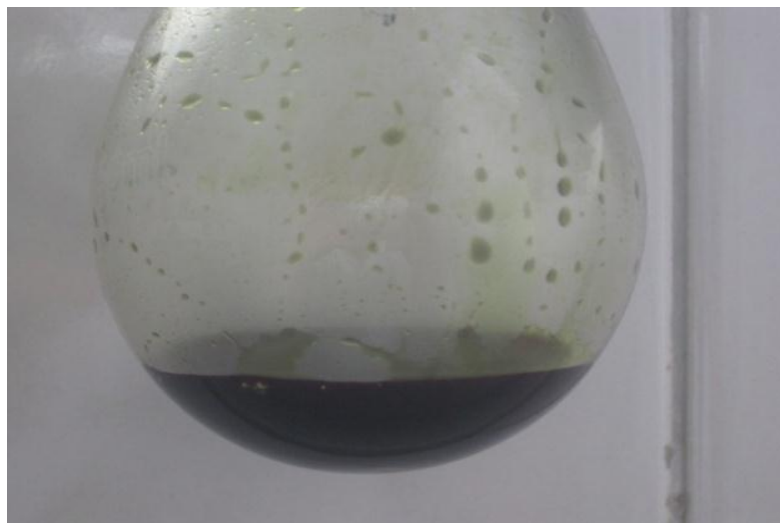


Figura 22. Aceite de semillas de *luffa cylindrica*.

6.4.1 CONTENIDO DE MATERIA INSAPONIFICABLE

La materia insaponificable obtenida del aceite de *luffa cylindrica* presentó una coloración amarilla y presentó un aspecto sólido (figura 23).

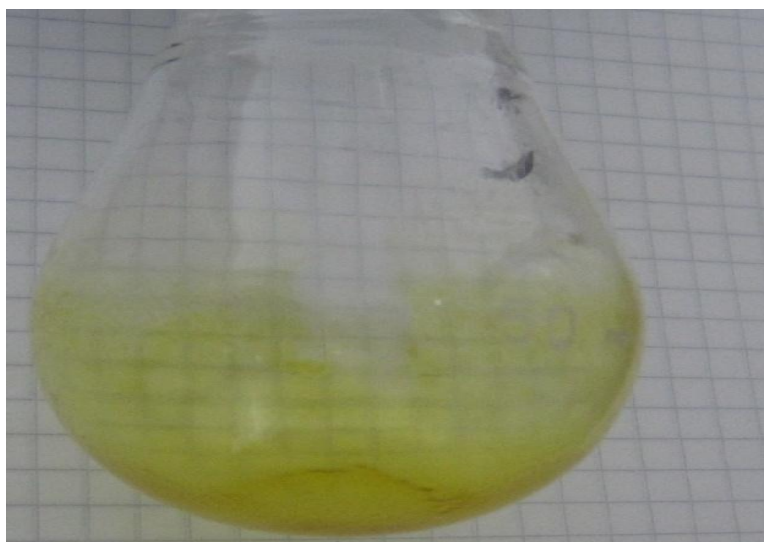


Figura 23. Materia insaponificable del aceite de semillas de *luffa cylindrica*.

Los porcentajes de rendimiento obtenidos se presentan en la tabla 12, como se observa, el contenido de materia insaponificable obtenido en este estudio es de 1,8465 %, al realizar la comparación con otros aceites vegetales como: girasol (0,58%), aceite de soya (0,5 - 1,5)%, aceite de palma (0,2- 0,3%), aceite de oliva

(0,5 - 1,5)% y aceite de maíz (1,4 – 1,6)% [7], la materia insaponificable obtenida del aceite de semillas de *luffa cylindrica*, presenta un rendimiento mucho mayor.

Muestra	Masa de aceite (g)	Peso materia insaponificable (g)	% rendimiento
1	3,5560	0,0700	1,9685
2	3,1418	0,0526	1,6741
3	3,3898	0,0643	1,8969
Promedio		0,0623	1,8465
Desviación estándar (SD)		0,1079	0,1535

Tabla 12. Datos obtenidos para la materia insaponificable.

6.4.2 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA.

Para evaluar las fracciones obtenidas de la materia insaponificable por extracción en fase sólida se utilizó la cromatografía de capa delgada (CCD).

6.4.2.1 Sistema uno (Acetato de Etilo)

Los resultados obtenidos por la cromatografía de capa delgada (CCD) de las fracciones obtenidas a partir de la extracción en fase sólida (EFS) se pueden observar en la figura 24. Las placas fueron reveladas con ácido fosfomolibdico (A) y los vapores de yodo, además se utilizo como estándar de referencia el colesterol un compuesto esteroidal para realizar comparaciones de los R_F .

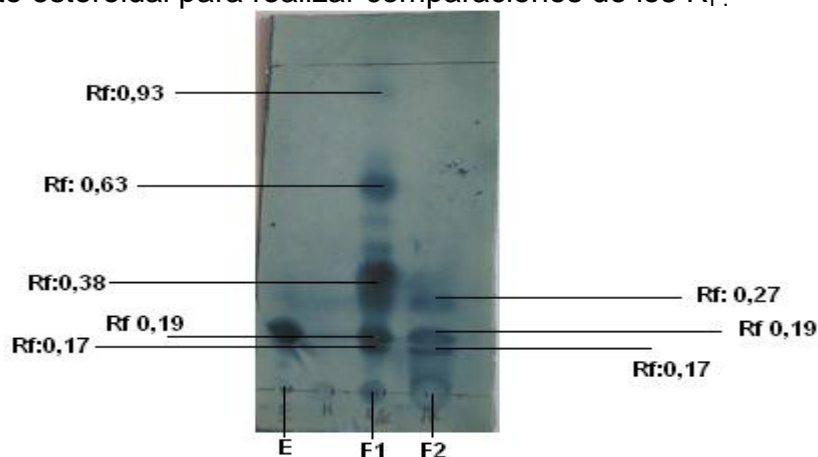


Figura 24. Placa cromatográfica revelada con ácido fosfomolibdico de las fracciones obtenidas para el sistema uno (acetato de etilo)

E: colesterol estándar

F1: Hexano: Acetato de Etilo (9:1)

F2: Acetato de etilo

En la figura 24, la cromatoplacla revelada con ácido fosfomolibdico (A) se puede observar una mancha del estándar (colesterol) (E) con un R_F 0,19. En la fracción uno (F1), se observan cinco manchas, la primera de ellas con un R_F 0,17 y la segunda mancha de R_F 0,19, De acuerdo con el sistema de separación empleado por otros autores según, reportan que los compuestos esteróicos revelan en un rango de R_f (0,17 – 0,22) [7, 80, 81, 82]; además al realizar la comparación con el estándar de referencia (E) su R_F es similar, confirmando al presencia de esteroles en la fracción uno. En la mancha tres con un R_F 0,38 se observa una mezcla por lo que no hubo una buena separación de los esteroles de otros tipos de compuestos, por ultimo, las manchas cuatro y cinco dieron valores de R_F 0,63 y 0,93 respectivamente, indicando la presencia de ácidos grasos libres y esterés de esteroles [80, 81, 82] en la fracción uno de la materia insaponificable.

En la fracción dos (F2) se pueden observar tres manchas, una de R_F 0,17 y otra con R_F 0,19 indicando la presencia de compuestos esteroidales según estudios previos [80], se observa una tercera mancha, la cual es un compuesto separado de la mezcla presentada en la fracción uno, su R_F 0,27 indica también la presencia de compuestos esteroidales según investigaciones previas [7, 81].

Las cromatoplaclas reveladas con vapores de yodo anexo 5, se observan resultados similares a los obtenidos con la cromatoplacla revelada con ácido fosfomolibdico. Lo que indica que en la materia insaponificable del aceite de semillas de *luffa cylindrica* hay presencia de compuestos con insaturación. De acuerdo a la información suministrada por cromatografía de capa delgada para el sistema uno, se evidenció que los esteroles (analitos de interés) se encontraban presentes en la fracciones (F1 y F2), por lo que no hubo una adecuada separación de los compuestos esteroidales de los demás tipos de compuestos presentes en la materia insaponificable.

6.4.2.2 Sistema Dos (Diclorometano)

Los resultados obtenidos por la cromatografía de capa delgada (CCD) de las fracciones obtenidas a partir de la extracción en fase sólida (EFS) se pueden observar en la figura 25, al igual que con el sistema anterior se realizó la comparación con el estándar de colesterol (E).

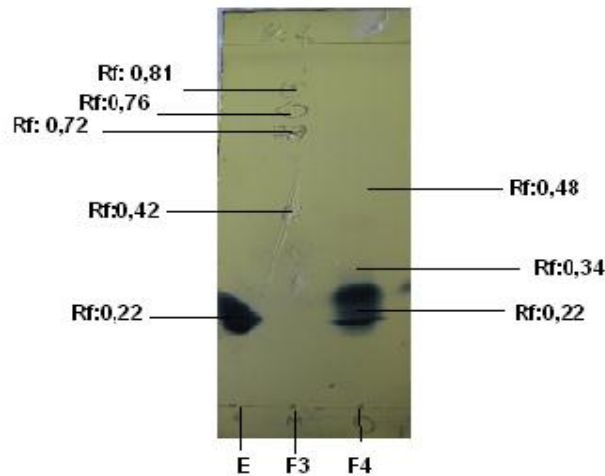


Figura 25. Placa cromatográfica revelada con ácido fosfomolibdico de las fracciones obtenidas para el sistema dos (diclorometano).

E: Colesterol estándar.

F3: Hexano: Diclorometano (9:1)

F4: Diclorometano.

En la figura 25, se presenta la cromatoplaqueta revelada con ácido fosfomolibdico (A), se realizaron tres siembras, la primera corresponde al estándar (colesterol) (E) con un R_F 0,22. La segunda denominada fracción tres (F3), se observan cuatro manchas, la primera de ellas con un R_F 0,42, la segunda mancha de R_F 0,72, la tercera y cuarta mancha de R_F 0,76 y R_F 0,81 respectivamente, indicando la presencia de ácidos grasos libres y esterés de esteróles [80, 82].

En cuanto a la fracción cuatro (F4) se pueden observar tres manchas, la primera de ellas tiene un R_F 0,22 y al comparar este parámetro con estudios previos R_f (0,17 – 0,22) [7, 80], y con el R_f del estándar sembrado se concluye que corresponde a los compuestos esterólicos (analitos de interés) en la fracción evaluada (F4), además se observaron otras dos manchas la primera de R_F 0,34 y la segunda de R_F 0,48 indicando la presencia de ácidos grasos en esta fracción [80, 82]. Las cromatoplaquetas reveladas con vapores de yodo anexo 5, arrojaron resultados muy similares, por lo cual se confirma la presencia de compuestos con insaturaciones en la fracciones tres y cuatro de la materia insaponificable del aceite de *luffa cylindrica*.

De acuerdo a la información suministrada por cromatografía de capa delgada para el sistema dos (diclorometano), se evidenció que los esteróles (analitos de interés) se encontraban únicamente en la fracción (F4), por lo que hubo una buena separación de los compuestos esteroidales en comparación con el sistema uno (acetato de etilo), por esta razón se sigue el sistema dos para realizar el análisis en separación en fase solida.

6.4.3 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN.

El porcentaje de recuperación de la técnica de extracción en fase sólida, se determinó mediante la contaminación de tres muestras de aceite de semillas de *luffa cylindrica*, con un patrón de 200 ppm de estigmasterol, esto se realizó por triplicado.

En la tabla 13, se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos para el estigmasterol en las muestras de aceite.

Muestra de Aceite	Concentración patrón (ppm)	Porcentaje de recuperación (%)			Promedio	Cv
1	200,00	112,53	110,40	109,96	110,96	1,2386
2	200,00	107,51	106,20	107,54	107,08	0,7145
3	200,00	113,25	112,28	111,70	112,41	0,6966

Tabla 13. Datos de porcentaje de recuperación para el estándar estigmasterol.

De acuerdo con los resultados de la tabla 13, la extracción en fase sólida (SPE) del estigmasterol exhibió muy buenos resultados con porcentajes de recuperación del analito en promedio de 110,15%, esto debido a que el aceite de *luffa cylindrica* presenta estigmasterol naturalmente, por eso al adicionar estigmasterol como estándar se potencia su respuesta en el equipo, y se obtienen valores superiores al 100%. Al comparar con la literatura científica, se encuentra que la recuperación de algunos fitoesteroles supera el 100%, como un ejemplo de esto se puede citar el aceite de oliva, en el cual se han reportado porcentajes de recuperación entre 100-120% para el estigmasterol y β -sitoesterol respectivamente [1,12]; por lo anterior se concluye que el método de recuperación del analito es bueno, debido a que los valores experimentales se acercan mucho a los encontrados en estudios previos.

6.5. ANÁLISIS DEL ACEITE DE *LUFFA CYLINDRICA*

La fracción de diclorometano obtenida a partir de la extracción en fase sólida, fue sometida a derivatización antes del análisis cromatográfico. Se utilizó la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama para la determinación de fitoesteroles siguiendo las mismas condiciones con que se analizaron los patrones.

En la figura 26, se puede observar el cromatograma de la fracción de diclorometano de la materia insaponificable del aceite de las semillas de *luffa cylindrica*; en el cromatograma se observan seis picos principales, que al compararlos con los tiempos de retención de los estándares, coinciden con los del β -sitoesterol y estigmasterol.

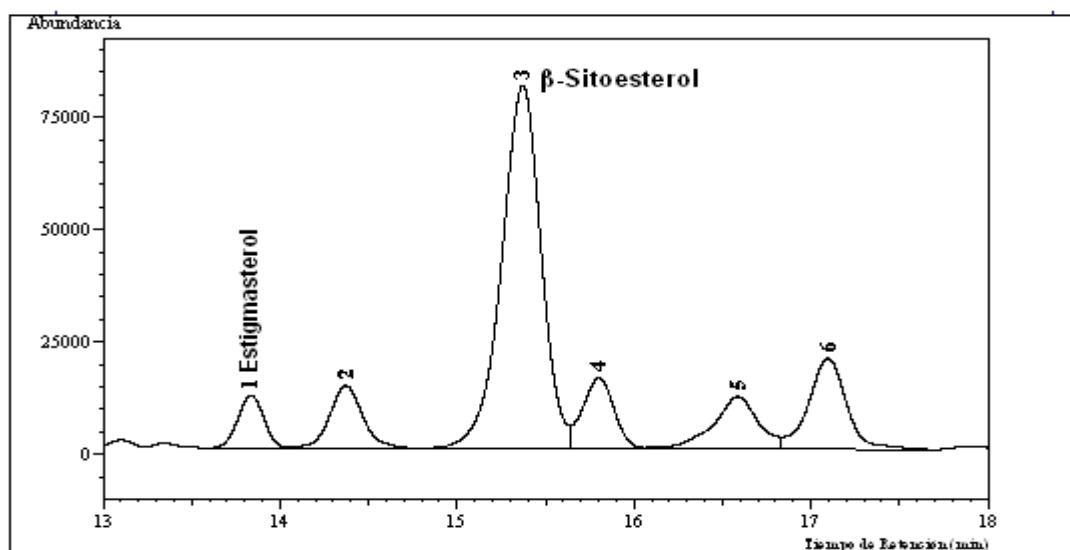


Figura 26. Cromatograma de la fracción de diclorometano.

El cálculo de la concentración de fitoesteroles se obtuvo tomando como punto de partida el peso del aceite de semillas de *Luffa cylindrica* obtenido en base seca (3,556g) llegándose a una concentración de 2551,1 mg de β -sitoesterol por Kg de aceite, en cuanto al contenido en las semillas se encontró una concentración de 222,91 mg por Kg de semilla. Al comparar el contenido de β -sitoesterol presente en el aceite de *Luffa cylindrica* con otros aceites comerciales se encuentra que es superior a el aceite de palma (350-410) ppm y oliva (1220-1300) ppm; su contenido es comparable con la cantidad presente en los aceites de girasol (1940-2570) ppm y de soya (1220-2310) ppm, no obstante es superado por el aceite de canola (3580-3950) ppm [69], y el de maíz (4540-5430) ppm [68, 71, 72, 73, 74].

En el aceite de semillas de *Luffa cylindrica* se encontró estigmasterol con una concentración de 211,19 mg de estigmasterol por Kg de aceite y una concentración en las semillas de 18,45mg de estigmasterol por Kg de semilla, el contenido de estigmasterol presente en el aceite de las semillas de *Luffa cylindrica* superó el contenido por los aceites de palma (70-100) ppm, oliva (0-30) ppm y canola (0-160) ppm [69], es similar al contenido por el aceite de girasol (180-320) ppm e inferior al contenido por los aceites de maíz (460-590) ppm y soya (450-760) ppm [70, 71].

A manera de ensayo se realizó una inyección de la fracción obtenida con el sistema de separación en fase sólida 1 (acetato de etilo) por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), cuyos resultados se analizaron por medio de la comparación de sus espectros de masas con los reportados por la biblioteca WILEY ACCESS PAC 7 ED y por el análisis de sus principales fragmentos. Sin embargo por tratarse de un ensayo, no se logró

obtener porcentajes de similaridad superiores al 85%, esto debido a que no hubo una separación adecuada de todos los componentes.

Pico	Tiempo de retención	Nombre	% Área	Concentración (ppm)	% Similitud
1	12,592	3-β,5-α-7-Ergosten-3-ol	7,15	462,17	76
2	13,575	3-β-5-α-22-ξ-7,22-Ergostadien-3-ol	49,61	3189,23	77
3	14,450	3-β-5,24(28)-Ergostadien-3-ol	10,19	652,17	75
4	14,850	Lanosterol	16,09	1045,82	86

Tabla 14. Análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la materia insaponificable del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

De acuerdo a la tabla 14, el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, se encontró que en el aceite de semillas de *luffa Cylindrica* contiene fitoesteroles, reiterando la composición revelada para la *luffa cylindrica* por parte de investigaciones previas [68].

En la figura 27, se muestra el espectro de masas del compuesto uno, con un tiempo de retención de 12,592 min y con ión molecular de M^+ 400 correspondiente al compuesto 3-β-5-α-7-Ergosten-3-ol de fórmula molecular $C_{28}H_{48}O$. Según sus principales fragmentos (figura 28) presenta iones importantes con valores m/z : 386 y 367, indican que este compuesto puede ser un esteroles. También pueden observarse los fragmentos con valores de m/z : 273 (pérdida de la cadena lateral saturada), 255 (perdida cadena lateral y agua), 231 (fisión del anillo D), 213 (fisión del anillo D y pérdida de agua), que indican la presencia del núcleo esteroidal [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. Adicionalmente, se presentaron otros fragmentos importantes m/z 161, m/z 147, m/z 69, m/z 55, m/z 43.

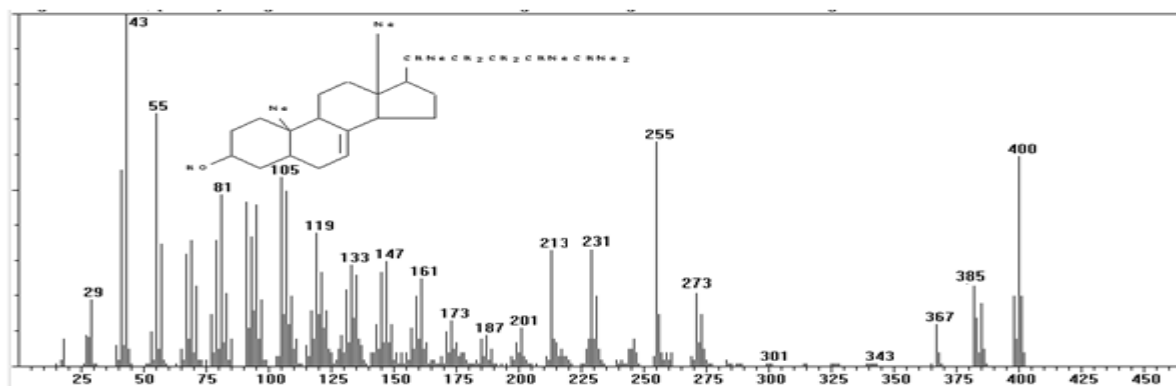


Figura 27. Espectro de masas del compuesto “3-β-5-α-7-Ergosten-3-ol”

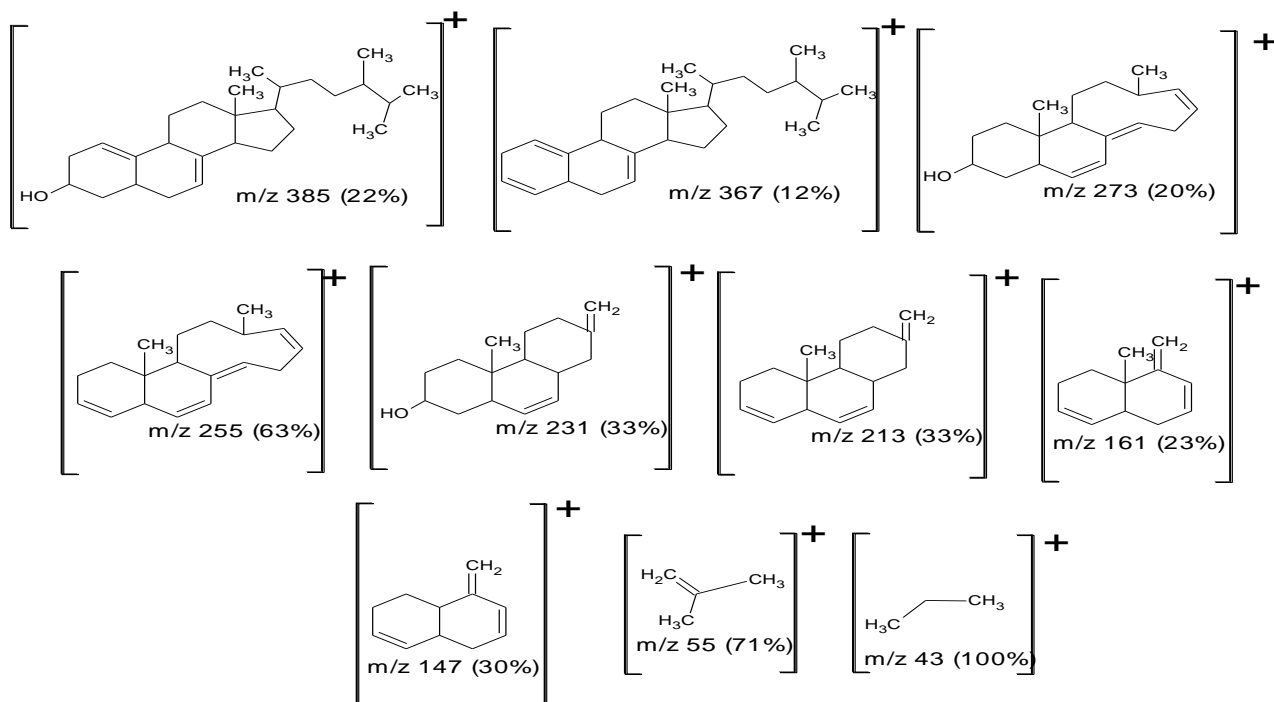


Figura 28. Principales fragmentos del compuesto “3-β-5-α-7-Ergosten-3-ol”

En la figura 29, se muestra el espectro de masas del compuesto dos, con un tiempo de retención de 13,575 y ión molecular con un valor de m/z 398 correspondiente al compuesto 3-β-5-α-22-ξ-7,22-Ergostadien-3-ol de fórmula $C_{28}H_{46}O$. Según sus principales fragmentos (figura 30) muestran iones característicos para esteroides como: m/z 383 (perdida de metil), m/z 300 (presencia de insaturación C-22), m/z 271 (perdida de la cadena lateral), m/z 255 (perdida de cadena lateral y agua), m/z 231 (fisión del anillo D) y m/z 213 (fisión del anillo D - agua) [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. Adicionalmente, se presentaron otros fragmentos importantes m/z 147, m/z 81, m/z 69 (42%), m/z 55.

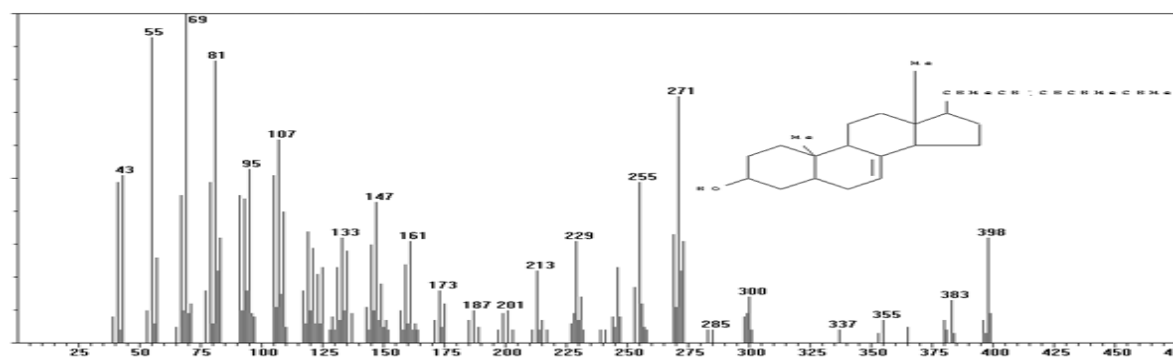


Figura 29. Espectro de masas del compuesto “3-β-5-α-22-ξ-7,22-Ergostadien-3-ol”

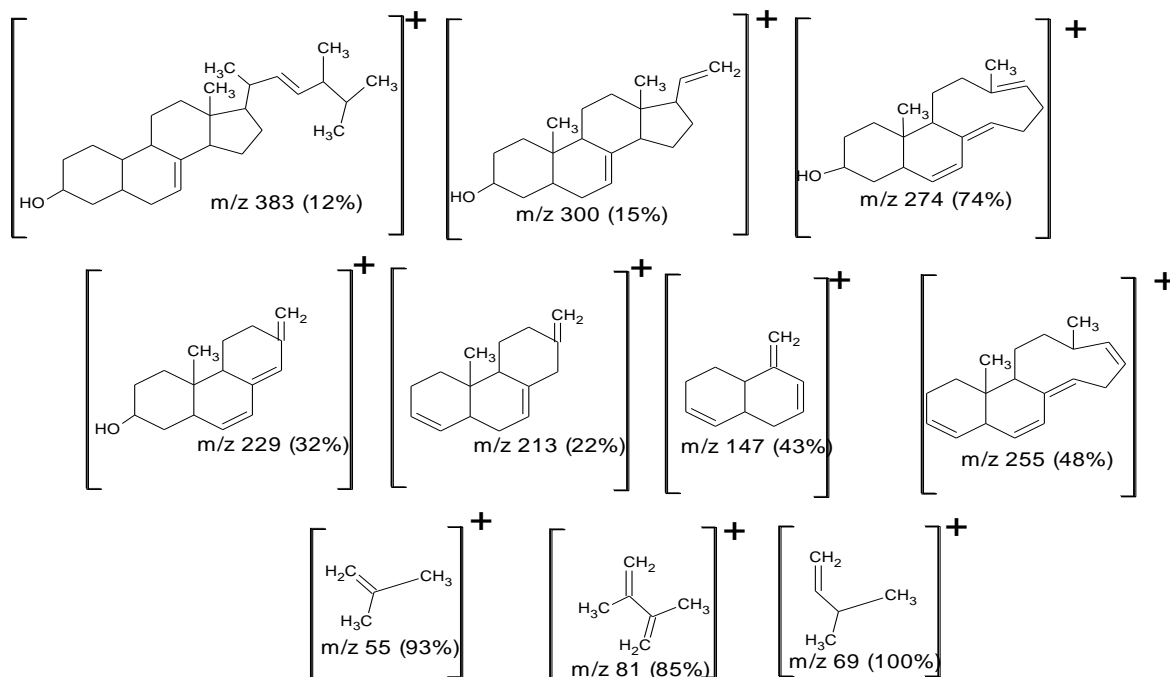


Figura 30. Principales fragmentos del compuesto “3-β-5-α-22-ξ-7,22-Ergostadien-3-ol.”

En la figura 31, se muestra el espectro de masas del compuesto tres, con un tiempo de retención de 14,450 min e ión molecular con un valor de m/z 398 correspondiente al compuesto “3-β-5,24(28)-Ergostadien-3-ol” de fórmula $C_{28}H_{46}O$. Según sus principales fragmentos (figura 32) muestran iones característicos para esteroides como: m/z 383 (pérdida de metil), m/z 314 (presencia de insaturación C-24) m/z 271 (pérdida de la cadena lateral), m/z 255 (pérdida de cadena lateral y agua), m/z 229 (fisión del anillo D) y m/z 213 (fisión del anillo D - agua) [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. Adicionalmente, se presentaron otros fragmentos importantes m/z 147, m/z 69, m/z 55.

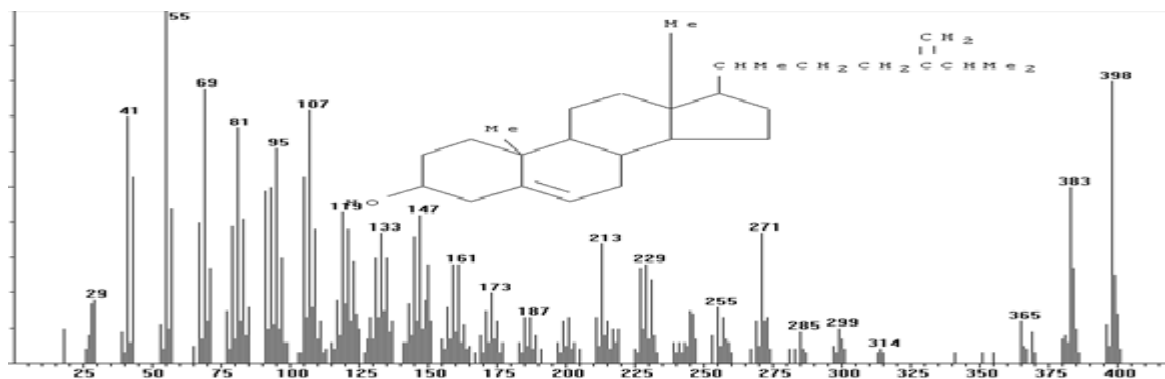


Figura 31. Espectro de masas del compuesto “3-β-5,24(28)-Ergostadien-3-ol”

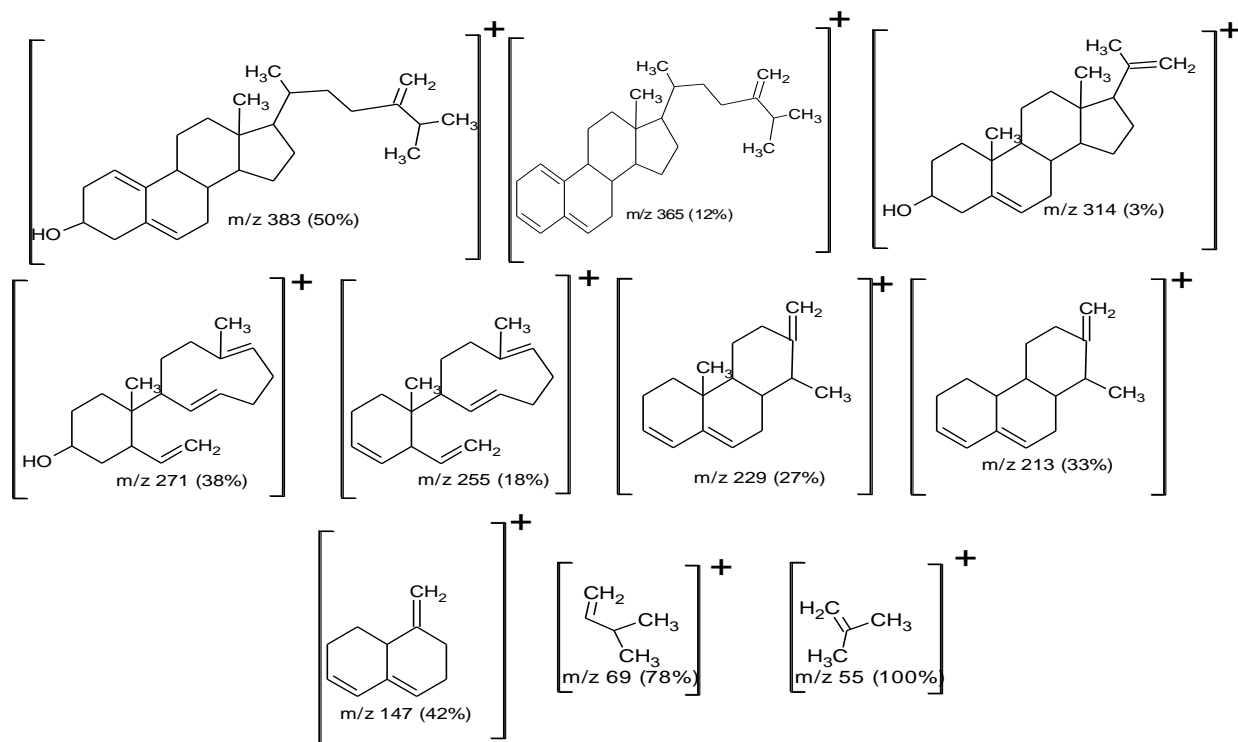


Figura 32. Principales fragmentos del compuesto 3-β-5,24(28)-Ergostadien-3-ol

En la figura 33, se muestra el espectro de masas del compuesto cuatro, con un tiempo de retención 14,850 min y un porcentaje de área de 16,09 % que corresponde al lanosterol, tiene como ión molecular de m/z 426 y fórmula $C_{30}H_{50}O$. En su espectro de masas se observa su pico base m/z 69, además se encontraron fragmentos característicos m/z 55, m/z 81 y m/z 95 de esteroides (figura 34) [49, 83], sin embargo no se tiene información suficiente para su plena identificación.

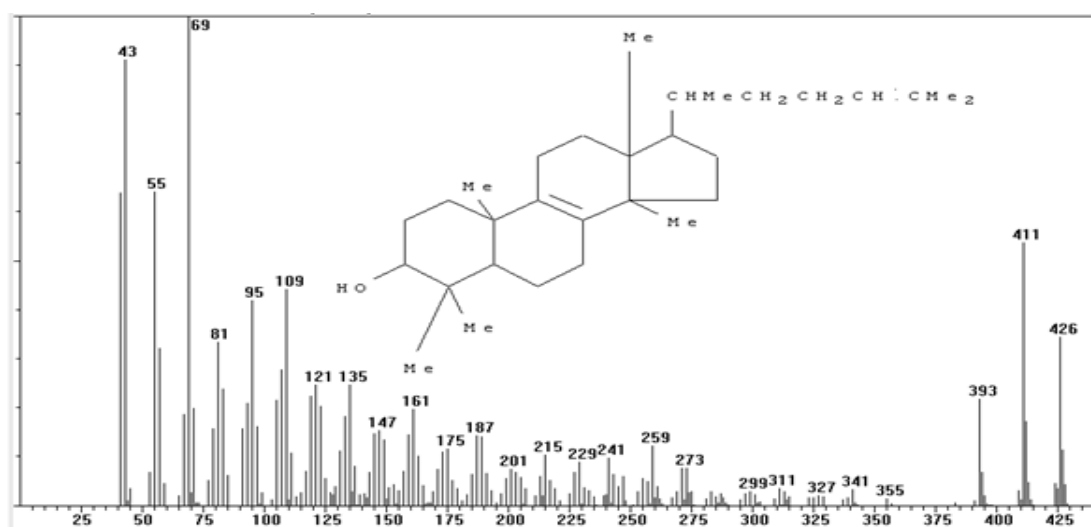


Figura 33. Espectro de masas del compuesto “Lanosterol.”

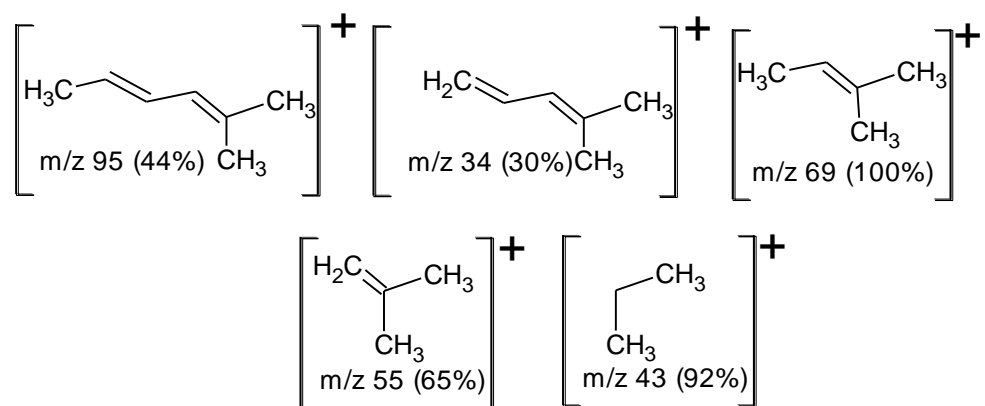


Figura 34. Principales fragmentos del compuesto “Lanosterol.”

7. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización en llama, para la cualificación y cuantificación de fitoesteroles.
- La cromatografía de gases con ionización en llama, para analizar fitoesteroles arrojó valores aceptables en las figuras de mérito: los coeficientes de correlación lineal (R^2) son mayores 0,999, los límites de detección y cuantificación están por debajo de 0,5 ppm, la exactitud presenta porcentaje de error menores al 5% y la precisión arrojó valores inferiores al 5% (C_v) indicando la precisión, reproducibilidad y repetibilidad de método demostrando así la validez de la técnica para el análisis de fitoesteroles .
- Se obtuvo el aceite de semillas de *luffa cylindrica* por medio de extracción soxhlet logrando un porcentaje de rendimiento de 8,45 % con un contenido de fracción insaponificable de 1,8465 %.
- Se evaluó la técnica de extracción en fase sólida (SPE), para obtención de fitoesteroles desde la fracción insaponificable encontrando un porcentaje de recuperación de 110,15 % con un coeficiente de varianza inferior al 2%.
- Se calculó el contenido de fitoesteroles en el aceite de la semilla de *luffa cylindrica* por cromatografía de gases con detector de ionización de llama arrojando valores de 2551,1 mg de β -sitoesterol por Kg de aceite y 211,19 mg de estigmasterol por Kg de aceite y un contenido en las semillas de *luffa cylindrica* en base seca de 222,91 mg β -sitoesterol por Kg de semillas, seguido de 18,45 mg de estigmasterol por Kg de semilla.
- Se evaluó el contenido de fitoesteroles en el aceite de semillas de *luffa cylindrica* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, encontrando la presencia de fitoesteroles, debido a que no se logro una adecuada separación de los compuestos, se obtuvieron espectros contaminados con porcentajes de similitud inferiores al 80%.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar la molienda de la semilla de *luffa cylindrica* en presencia DE atmosfera de nitrógeno, lo cual permitiría evitar la degradación o cambios en la composición del aceite.
- Para evitar las interferencias del color, realizar una decoloración con una mezcla de carbón activado y silica gel (1:1) a la solución en hexano tanto del aceite como de la materia insaponificable y determinar cual tiene menos perdida del analito.
- Adquirir otros estándares que permitan la identificación y cuantificación de otros esteroides presentes en aceites vegetales
- Realizar un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) con un cambio en las condiciones del método que permita una adecuada separación de los picos y por tanto una mejor identificación de los compuestos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ROCCO, A., FANALI, S. 2009. Analysis of phytosterols in extra-virgin olive oil by nano-liquid chromatography *Journal of Chromatography. A*, Volume 1216, Issue 43, 23. 7173-7178.
- [2] ARANCETA, J., GIL, A. 2010 *Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil*, Primera Edición. Pag. 85.
- [3] SANHUEZA, J., NIETO, S. 2002. ¿Es posible mejorar la calidad nutricional de los aceites comestibles? *Revista nutrición chilena*, Vol. 29, Suplemento N°1. 10p.
- [4] AZADMARD-DAMIRCHI, S., DUTTA, P.C. 2009. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *Journal of Chromatography A*, Volume 1216, Issue 1. 36-42.
- [5] BAIYI, L., YING, zhang., XIAOQIN Wu., JIAYI, Shi. 2007. Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry *Analytica Chemical Acta*,
- [6] FERNADEZ, P., CABRAL, J. 2007. Phytoesterol: applications and recovery methods. *Bio resource technology*; 98: 2335-2350.
- [7] FERNÁNDEZ TENORIO, J.; ARCILA GONZÁLEZ, L. Estudio de la fracción insaponificable obtenida del aceite extraído de la semilla de la *Luffa cylindrica*. Pereira 2008. Tesis de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías.
- [8] TOKIOKA, K; KISHIMOTO, S; Cosmetic, Agos. 2001 [Citada 14 de junio de 2011] (Cosmeticos). Disponible en Internet: < ep.espacenet.com
- [9] MATSUMOTO, M; KOBAYASHI, Y; Preparation for External use for skin, Feb. 2000 [Citada 14 de junio de 2011] (Preparación para uso externo en la piel). Disponible en Internet: <ep.espacenet.com
- [10] ACHIGAN DAKO, E.G.; *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem., 2011 [Citada 14 de abril de 2012]. Disponible en Internet: <<http://www.prota4u.info/>>.
- [11] WEN-HUI, Liu., BIN, Ding., XIAO-MING, Ruan., HAI-TAO, Xu., JUN, Yang., SHAO-MIN, Liu. 2007. Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography–flame ionization detection of *Chromatography A*, Volume 1163, Issues 1-2. 304-311.

- [12] CUNHA, S. S., FERNANDES, J. O., OLIVEIRA M. B.P.P. 2006. Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, Volume 1128, Issues 1-2. 220-227
- [13] ARANCETA, J., GIL, A., comité de nutrición. 2010. *Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil*. Primera edición. Editorial medica panamericana
- [14] SKOOG, D.A., HOLLER F.J. 2008. *Principios de análisis instrumental*, sexta edición. Cengage Learning. México.
- [15] AGUIRRE ORTEGA, L.; et al. 2001. Validación de métodos analíticos. La asociación española de farmacéuticos de la industria (AEFI). España.
- [16] ISAZA, HIPOLITO. 1996. Extracción en fase sólida, fundamentación y desarrollo de aplicaciones. *science et technica* 3.
- [17] MILLER J.C., MILLER J.N., 2000. Estadística y quimiometría para química analítica, Cuarta edición. Pag 100-101,125.
- [18] SHERMA, J., FRIED, B. 2003. *Handbook of thin layer chromatography*, Tercera edición. Editorial: Marcel Dekker, Inc. Pag 62.
- [19] Técnicas Cromatográficas, Universidad Nacional Autónoma De México (UNAM), 2007, [Citada el 14 de Julio de 2011] Disponible en internet :<depa.fquim.unam.mx>.
- [20] SORGOB SÁNCHEZ, M.A.; VILANOVA GILSBERT, E. 2004. *Técnicas analíticas de contaminantes químicos*, editorial Díaz de Santos S.A. España. Pag.27-28.
- [21] AZADMARD-DAMIRCHI, S., DUTTA, P.C. 2006. Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils. *Journal of Chromatography. A*, Volume 1108, Issue 2. 183-187
- [22] XIN ZHANG, JULIEN-DAVID, D., MIESCH, M., GEOFFROY, P., RAUL F., ROUSSI, S., AOUDE-WERNER, D., MARCHIONI, E. 2005. Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Steroids*, Volume 70, Issue 13.896-906
- [23] OBOH, I., ALUYOR, E., AUDU, Y. Post-treatment of Produced water before discharge using *Iuffa cylindrica*. 2009. *Journal of Agricultural Research* Vol. 4 (8), pp. 684-688.

- [24] MCNAIR, H.M., MILLER J. M. 2009. Basic gas chromatography. Segunda edición. John wiley & sons, inc., publication.
- [25] HARRIS, M.D. 2007. Análisis químico cuantitativo. Sexta edición. Editorial Reverté. (578-583).
- [26] ABIDI, S.L. 2001. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. Journal of Chromatography A, Volume 935, Issues 1–2, 23.
- [27] LISSBRANT, S., Comparación de la germinación y primer crecimiento de semillas de estropajo con y sin pre-tratamiento hídrico. 2011
- [28] PALLAVI, S., SAMIRAN, D., ALKA, A., NAGARAJAN, K., PRANJAI, S. *Luffa Cylindrica*: biological actions and medicinal applications. 2011.
- [29] PHARMASOLG, BH. Compositions containing lipid micro- or nanoparticles for the enhancement of the dermal actions of solid particles.2008. EP 2 218 447 A1.
- [30] MACARULLA, J; Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural 2002. Editorial: reverté. Tercera edición (58).
- [31] McMURRY, J. Química Orgánica 2008. Editorial: Cengage Learning editores, S.A. Séptima edición (1060-1061).
- [32] TEIJON, J., GARRIDO, A. Fundamentos de bioquímica estructural 2006. Editorial: Tebár S.L. Segunda edición (346-350).
- [33] YUFERA, E. Química orgánica básica y aplicada 2007. Editorial: reverté. Segunda edición (947-948).
- [34] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Grasas y aceites en la nutrición humana. [Citada 26 de octubre de 2011]. Disponible en internet<<http://www.fao.org/docrep/v4700s/v4700s00.HTM>.
- [35] HEGGEN, E., GRANLUND, L., PEDERSEN, J.I., HOLME, I., CEGLAREK, U., THIERY, J., KIRKHUS, B., TONSTAD, S. 2010.Plant sterols from rapeseed and tall oils: Effects on lipids, fat-soluble vitamins and plant sterol concentrations. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Volume 20, Issue 4.258-265.
- [36] DONOSO, C., PREMOLI, A., GALLO, L. 2004. Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Argentina y Chile. Primera edición. Pag. 339

- [37] SERRANO, M.E., LÓPEZ, M., SAINZ, T.R.2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de ciencia farmaceutuca volume 3, numero 004, 60-61
- [38] EC. COMMISSION REGULATION (EC) No 608/2004 of 31 March 2004 concerning the labelling of foods and food ingredients with added phytosterols, phytosterol esters, phytostanols and/or phytostanol esters. Off J Eur Communities2004; L 97: 44-45.
- [39] HAN, Jun-Hua., YANG, Yue-Xin., FENG, Mei-Yuan. 2008. Contents of Phytosterols in Vegetables and Fruits Commonly consumed in China, Biomedical and Environmental Sciences, Volume 21, Issue 6, Pages 449-453.
- [40] SUNDARARAMAN, P., DJERASSI, C. 1977. A convenient synthesis of progesterone from stigmasterol. Journal organic chemistry, pages 42.
- [41] MIKIKO, K., MASARU, S., NOBUHIKO, O., MAKOTO, T. Composition for external application to skin.2010.
- [42] Kao Corporation Chuo-Ku. Cosmetics and make up method. 2011. EP 01 415 639 B1
- [43] SHISEIDO, Company Limited. Composition for skin or hair. 2008. EP 2 127 634 A1
- [44] SHISHELDO CP., Ltda. Hair conditioner composition and low- energy manufacturing method for the same. 2010. EP 2 394 632 A1.
- [45] Gobierno Del Estado de Chiapas secretaria de desarrollo social proyecto desarrollo social integrado y sostenible. Asesoría Técnica para la producción, manejo y comercialización de Estropajo (Loofha) en la Región de la Selva. (UMAC). 2005.
- [46] SHUKLA V., INAMDAR S., Protective effect of Luffa Cylindrica fruit extract on alloxan intoxicated diabetic rats. 2011.
- [47].MARTÍNEZ, A. ESTEROLES. Abril de 2002, [Citada 4 de noviembre de 2012]. Universidad de Antioquia. Disponible en Internet: <<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esteroles2001.pdf>>
- [48]BENAVIDES CALVACHE, O.L. Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo *macromicetoLentinulaedodes(Shiitake)*. Bogotá 2004. Tesis de grado magister en ciencias químicas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

- [49] CAIXIANG, Z., YANXIN, W., SHIHUA, Q. 2008. Identification and significance of sterols in MSW landfill leachate. *Journal of chromatography B*, volume 874, issues 1-2, 15, pages 1-6.
- [50] BROOKS, C. J. W., HORNING, E. C., YOUNG, J. S. Characterization of Sterols by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of the Trimethylsilyl Ethers. Institute for Lipid Research, Baylor University College of Medicine, Houston, Texas, and Department of Chemistry, University of Glasgow, Scotland.
- [51] NEYRA JURADO, M. E. 2011. Evaluación química, posible letalidad y citotoxicidad del alga invasora *kappaphycusalvarezii*. Trabajo de grado. Universidad de Oriente. Escuela de ciencia. Departamento de química.
- [52] CHERIF, A., BELKACEMI, K., KALLEL, H., ANGERS, P., ARUL, J., BOUKHCHINA, S. 2009. Phytosterols, unsaturated fatty acid composition and accumulation in the almond kernel during harvesting period: Importance for development regulation. *Comptes Rendus Biologies*, Volume 332, Issue 12, Pages 1069-1077.
- [53] NIETO, I.; VALENCIA, M. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *ganodermaaustrale*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. Vo.47, No.4 (2002).
- [54] VALLE, H., SANTAFÉ, Gilmar. Esteroles libres de la esponja marina *Mycale laevis*. 2009. *Revista Vitae*. Vo.16, No.1
- [55] RONCO, A.M., VALENZUELA, A. 2004. Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular *Rev Chil Nutr* Vol. 21, Suplemento N° 1. 161-169.
- [56] WEN LIN XU, YI BO HUANG, JUN HONG QIAN, OU SHA, YA QIONG WANG. 2005. Separation and purification of stigmasterol and β -sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method. *Separation and Purification Technology*, Volume 41, Issue 2. 173-178.
- [57] CANOZA, M.P. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosan y parabenos. 2001. Editorial: Universidad Santiago de Compostela. Primera edición (38).
- [58] FLANAGAN, R.; TAYLOR, A.; WATSON, I. A.; WHELPTON, ROBIN. *Fundamentals of analytical toxicology*. 2009. Editorial: wiley. P 164-165.
- [59] PICARD, H; GUYOT, B; VINCENT, J. 1984. *Café cacao thé*. Vol. XXVIII, n° 1. Laoratoire de chimie et de technologie. Institut de recherché du café, du cacao el aures plantes stimulantes. France.

[60] HERRERA., BOLAÑOS, N., LUTZ, G. Química de alimentos 2003. Editorial: Universidad de Costa Rica, primera edición (4-5)..

[61] CORREA, S. 2010. Determinació de diferents compostos bioactius en ingredients naturals per a l'elaboració de bombons funcionals amb beneficis cardiovasculars. Food Chemistry, 23-25.

[62] SANTOS, R.; et al. 2006, Optimization of analytical procedures for GC–MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yogurt. Food Chemistry, Volume 102, Issue 1, 2007, Pages 113-117.

[63] HUETOS, O; Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas. Madrid 2004. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

[64] FANG KAI, PAN XUE-JUN, HUANG BIN, LIU JING-LIANG, WANG YU, GAO JIAN-PEI. 2010. Progress on Keto Groups Derivatization of Steroid Hormones in Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. Chinese Journal of Analytical Chemistry, Volume 38, Pages 743-751.

[65] SCHUMMER C., DELHOMME O., BRICE M.R., WENNIG R., MILLET M. 2009. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. Talanta, Volume 77, Issue 4, Pages 1473-14.

[66] AHMIDA, M., BERTUCCI, P., FRANZÒ, L., MASSOUD, R., CORTESE, C., LALA, A., FEDERICI., G. 2006. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). Journal chromatography b, volumen 842, issue 1, 14 pages 43-47.

[67] PHILLIPS K. M., RUGGIO D. M, BAILEY J. A. 2002. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas–liquid chromatography Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Volume 732, Issue 1, Pages 17-29.

[68] ADEWUYI, A., ODERINDE, P.A. 2012. Analysis of the lipids and molecular speciation of the triacylglycerol of the oils of *Luffa cylindrica* and *Adenopus braviflorus*. Journal of food. First article 1-8.

[69] ALANDER J., ANDERSSON A.C., LINDSTRÖM C. 2006. Cosmetic emollients with high stability against photo-oxidation. Lipid Technology.

[70] TABEE E. 2008. Lipid and Phytosterol Oxidation in Vegetable Oils and Fried Potato Products. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences.

- [71] KEMALG.L. M., AMAR S. 2006. Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Cell and Molecular Biology* 5: 71-79.
- [72] KAKADE, A. N., MAGDUM, C.S. 2012. HPLC analysis of β -sitosterol in herbal medicine and vegetable oils. *International journal of pharmacy & life sciences*.
- [73] CHAI J.W., KUPPUSAMY U.R., KANTHIMATHI M.S. 2008. Beta-sitosterol Induces Apoptosis in MCF-7 Cells. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 16(2), 28-30 28.
- [74] AWAD A.B., CHINNAM M., FINK C.S., BRADFORD P.G. 2007. β -Sitosterol activates Fast signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine* 14, 747–754.
- [75] LIM L., JACKSON-LEWIS V., WONG L.C., SHUI G.H., GOH A.X.H., KESAVAPANY S., JENNER A.M., FIVAZ M., PRZEDBORSKI S., WENK M.R. 2012. Lanosterol induces mitochondrial uncoupling and protects dopaminergic neurons from cell death in a model for Parkinson's disease.
- [76] HOLICK, M. F. PhD, The Vitamin D Deficiency Pandemic: a Forgotten Hormone Important for Health. Department of Medicine, Section of Endocrinology, Nutrition, and Diabetes. Vitamin D, Skin and Bone Research Laboratory, Boston University Medical Center, Boston University.
- [77] YUAN J.P., WANG J.H., LIU X., KUANG H.C., HUANG X.N. Determination of Ergosterol in Ganoderma Spore Lipid from the Germinating Spores of *Ganoderma lucidum* by High-Performance Liquid Chromatography. Food Engineering Research Center of State Education Ministry, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, People's Republic of China
- [78] PHILLIPS K. M., RUGGIO D. M., HORST R. L., MINOR B., SIMON R.R., FEENEY M.J., BYRDWELL W.C., HAYTOWITZ D.B. 2011. Vitamin D and Sterol Composition of 10 Types of Mushrooms from Retail Suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- [79] Norma Colombiana ICONTEC NTC 235-2. Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación de la materia insaponificable. Método de extracción con Hexano. Instituto Colombiano de Normas Técnicas. Santa Fe de Bogotá. 2002.
- [80] JOHANSSON-KORNFELDT, A. Sterols in vegetable oils: aspects of biological variation, influence of technological treatment and the use of sterols to identify vegetable oils. ept. of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1979.

[81] VALDERRAMA, J. O. información tecnológica. Volumen 1, numero1. 2000.p45.

[82] KOOLMAN, J., ROHM, K. H. Bioquímica. 2004. Editorial medica panamericana, tercera edicion (54-55-56).

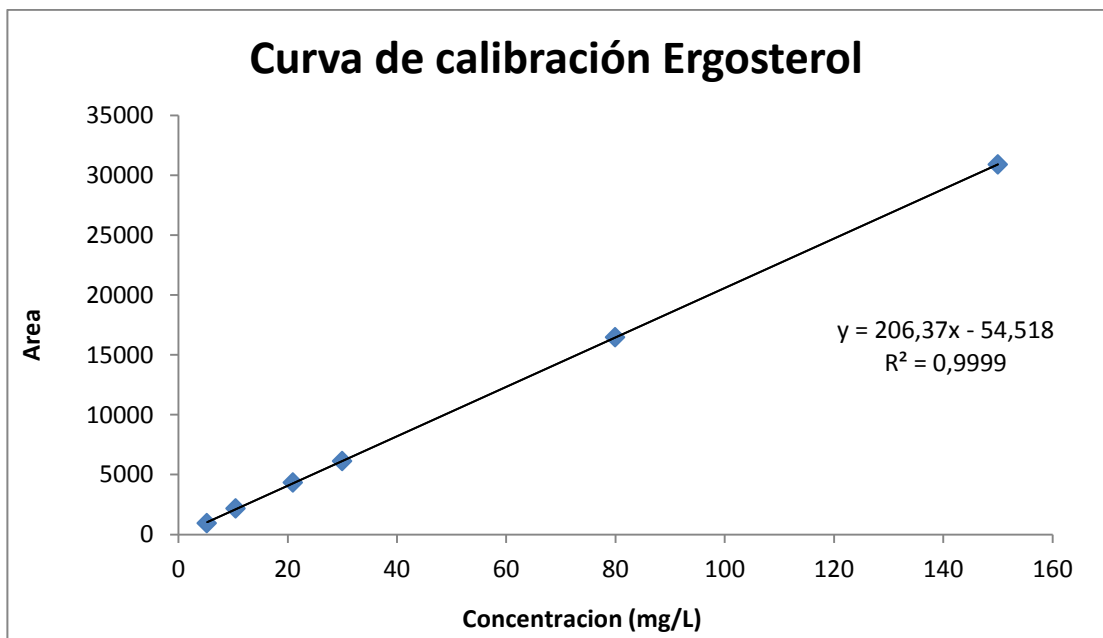
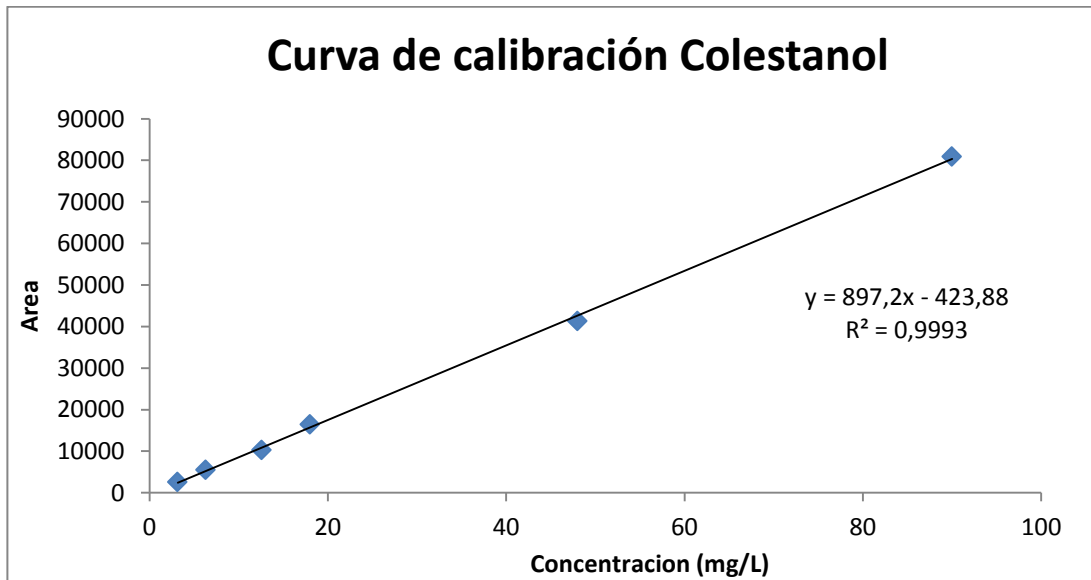
[83] TRÖSKEN, E. R., STRAUBE, E., LUTZ, W. K., VÖLKEL, W., PATTEN C. Quantitation of lanosterol and its major metabolite FF-MAS in an inhibition assay of CYP51 by azoles with atmospheric pressure photoionization based LC-MS/MS. 2004. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

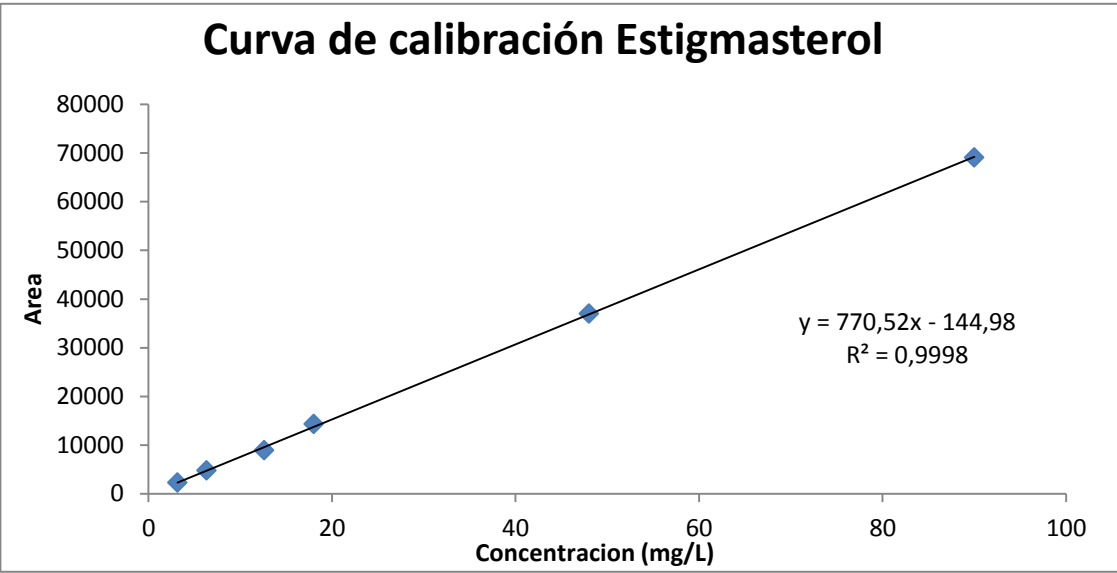
10. ANEXOS

ANEXO 1. Datos obtenidos de áreas para la elaboración de las curvas de calibración.

ÁREA								
Vial	mg/L	COLESTANO	mg/L	COLESTANOL	mg/L	ERGOSTEROL	mg/L	ESTIGMASTEROL
1	2,1	1845	3,15	2608	5,25	933	3,15	2224
2		1858		2611		929		2240
3		1831		2588		934		2271
	PROMEDIO	1844	PROMEDIO	2602	PROMEDIO	932	PROMEDIO	2245
	SD	13,53	SD	12,64	SD	3,17	SD	24,33
	%CV	0,73	%CV	0,49	%CV	0,34	%CV	1,08
1	4,2	3868	6,3	5583	10,5	2159	6,3	4769
2		3833		5579		2162		4739
3		3828		5514		2198		4805
	PROMEDIO	3843	PROMEDIO	5559	PROMEDIO	2173	PROMEDIO	4771
	SD	21,95	SD	38,43	SD	21,28	SD	32,82
	%CV	0,57	%CV	0,69	%CV	0,98	%CV	0,69
1	8,4	7684	12,6	10317	21	4360	12,6	8889
2		7532		10418		4334		8898
3		7595		10133		4270		9011
	PROMEDIO	7693	PROMEDIO	10290	PROMEDIO	4325	PROMEDIO	8933
	SD	76,350	SD	144,43	SD	47,64	SD	67,56
	%CV	1	%CV	1,40	%CV	1,11	%CV	0,76
1	12	11145	18	16439	30	6174	18	14313
2		11056		16311		6032		14322
3		11078		16716		6163		14203
	PROMEDIO	11093	PROMEDIO	16489	PROMEDIO	6123	PROMEDIO	14279
	SD	46,41	SD	207,01	SD	79,18	SD	66,15
	%CV	0,42	%CV	1,26	%CV	1,29	%CV	0,46
1	32	27137	48	41050	80	16556	48	36986
2		27344		41577		16458		36724
3		27593		41424		16390		37306
	PROMEDIO	27358	PROMEDIO	41351	PROMEDIO	16468	PROMEDIO	37005
	SD	228,10	SD	217,18	SD	83,76	SD	291,61
	%CV	0,83	%CV	0,66	%CV	0,51	%CV	0,79
1	60	49872	90	80747	150	30720	90	68984
2		50164		81004		31030		69228
3		50008		80989		30919		69051
	PROMEDIO	50015	PROMEDIO	80913	PROMEDIO	30890	PROMEDIO	69088
	SD	145,81	SD	144,11	SD	157,28	SD	125,89
	%CV	0,29	%CV	0,18	%CV	0,51	%CV	0,18

Anexo 2. Curvas de calibración.





ANEXO 3. Datos para obtener la repetibilidad del método.

ÁREA								
Vial	mg/L	COLESTANO	mg/L	COLESTANOL	mg/L	ERGOSTEROL	mg/L	ESTIGMASTEROL
1	2,1	1943	3,15	2715	5,25	1052	3,15	2445
2		1945		2739		1063		2442
3		1967		2725		1068		2414
	PROMEDIO	1952	PROMEDIO	2726	PROMEDIO	1061	PROMEDIO	2434
	SD	13,34	SD	12,47	SD	8,21	SD	17,30
	%CV	0,68	%CV	0,46	%CV	0,77	%CV	0,71
1	8,4	7554	12,6	10521	21	4369	12,6	8856
2		7594		10544		4431		8868
3		7531		10695		4403		8805
	PROMEDIO	7560	PROMEDIO	10587	PROMEDIO	4401	PROMEDIO	8843
	SD	31,58	SD	94,28	SD	31,01	SD	33,60
	%CV	0,42	%CV	0,89	%CV	0,70	%CV	0,38
1	32	28755	48	44288	80	17848	48	39836
2		28943		44477		17760		39715
3		28756		45057		17820		39545
	PROMEDIO	28818	PROMEDIO	44607	PROMEDIO	17809	PROMEDIO	39698
	SD	108,16	SD	400,39	SD	44,97	SD	146,13
	%CV	0,38	%CV	0,90	%CV	0,25	%CV	0,37

Anexo 4. Valores de t para diferentes niveles de probabilidad

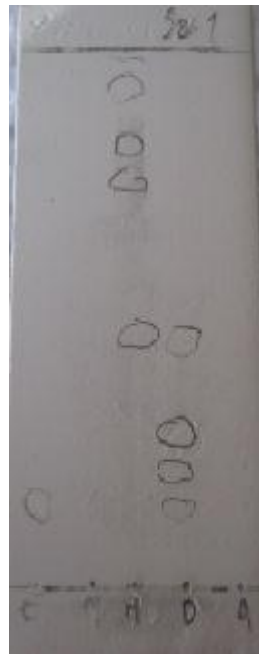
Grados de libertad	Valor para un intervalo de confianza (%)				
	80	90	95	99	99,9
1	3,08	6,31	12,7	63,7	637
2	1,89	2,92	4,30	9,92	31,6
3	1,64	2,35	3,18	5,84	12,9
4	1,53	2,13	2,78	4,60	8,60
5	1,48	2,02	2,57	4,03	6,86
6	1,44	1,94	2,45	3,71	5,96
7	1,42	1,90	2,36	3,50	5,40
8	1,40	1,86	2,31	3,36	5,04
9	1,38	1,83	2,26	3,25	4,78
10	1,37	1,81	2,23	3,17	4,59
11	1,36	1,80	2,20	3,11	4,44
12	1,36	1,78	2,18	3,06	4,32
13	1,35	1,77	2,16	3,01	4,22
14	1,34	1,76	2,14	2,98	4,14
∞	1,29	1,64	1,96	2,58	3,29

[14]

Anexo 5. Placas reveladas con vapores de yodo.



Placas revelada con vapores de yodo para sistema uno.



Placa revelada con vapores de yodo para sistema dos.