

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS  
Y BIOTECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS  $\alpha$ -LINOLÉNICO, LINOLÉICO Y  
OLEICO LIBRES EN ACEITES VEGETALES. AREQUIPA-2013**

**TESIS PRESENTADA POR EL BACHILLER  
EN FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA:**

*GONZALES CONDORI, ELVIS GILMAR*

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL  
DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

ASESOR: Q.F. MOCITA HESET DE LA  
FUENTE TORRES.

**AREQUIPA – PERÚ**

2013

INDICE

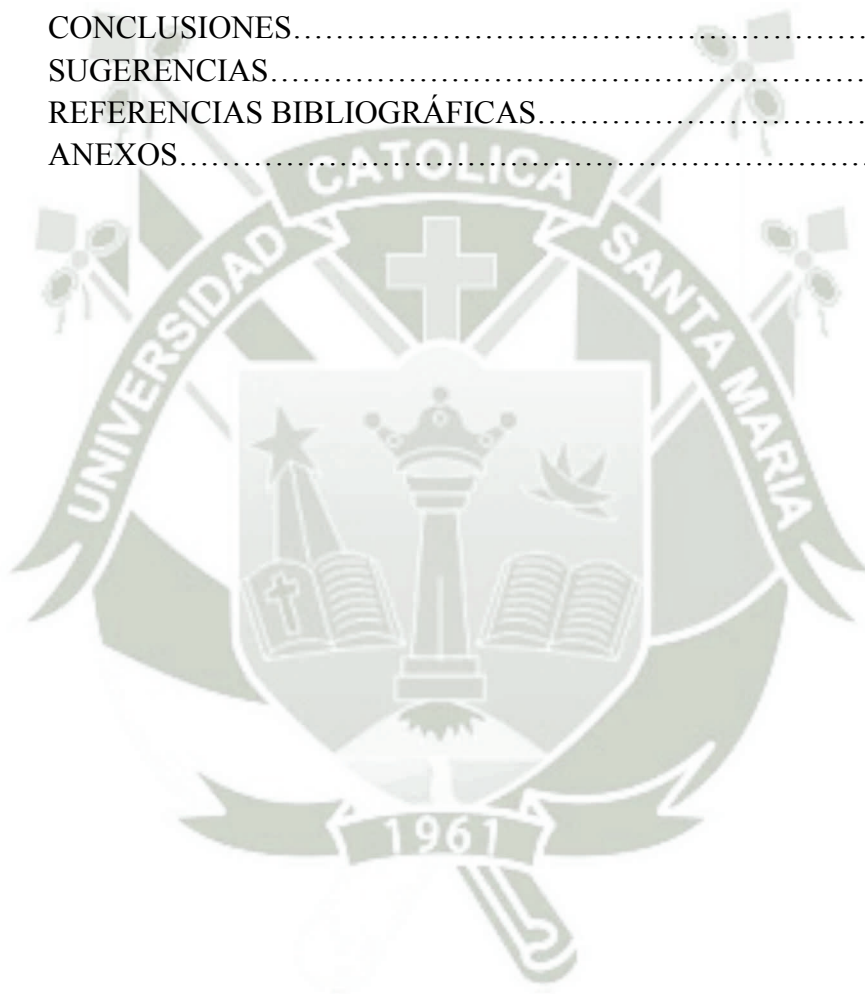
	Pág.
<b>CONTENIDO</b>	
Resumen.....	1
Summary.....	3
<b>CAPITULO I</b>	
Introducción.....	5
Objetivos.....	7
Hipótesis.....	8
<b>CAPITULO II</b>	
Marco teórico.....	9
1. Ácidos grasos.....	9
1.1.Ácido oleico.....	11
1.2.Ácido linoléico.....	13
1.3.Ácido $\alpha$ -linolénico.....	14
2. Aceites y grasas comestibles.....	16
3. Aceite vegetal.....	16
3.1.Sacha Inchi.....	17
3.2.Linaza.....	20
3.3.Soja.....	21
3.4.Zapallo.....	24
4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	26
4.1.Formas de cromatografía líquida.....	27
4.2.Bases de la separación cromatográfica.....	28
4.3.Partes.....	30
5. Método analítico.....	35
5.1.Validación de un método analítico.....	36
5.2.Parámetros analíticos.....	38
5.2.1. Especificidad o selectividad.....	38
5.2.2. Linealidad e intervalo.....	38
5.2.3. Precisión.....	39
5.2.4. Exactitud.....	39
5.2.5. Sensibilidad.....	39

### CAPITULO III

1. Muestra.....	40
2. Ambiente Utilizado.....	40
3. Materiales, reactivos y equipos.....	41
4. Métodos.....	43

### CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	84
SUGERENCIAS.....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXOS.....	97



## DEDICATORIA

A Dios. Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado la vida para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres. Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, por sus ejemplos de perseverancia y constancia, por sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por ser las personas que me enseñaron a ser quien soy, pero más que nada, por su amor incondicional.

A mis hermanos. Por estar siempre a mi lado incondicionalmente apoyándome moralmente, impulsándome a no rendirme.

Al mis profesores: PhD. José Villanueva Salas y Q.F. Mocita Hesel de la Fuente Torres. Por su paciencia, entrega, confianza y asesoramiento que hizo posible llevar a cabo mis metas trazadas.

## RESUMEN

Estudios previos registrados por organismos como la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) sugiere que el consumo de ácido oleico, linoléico y  $\alpha$ -linolénico, podrían estar relacionadas con la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes mellitus, artritis reumatoide, asma, etc.

El presente trabajo tuvo por objetivo validar e implementar una metodología analítica por cromatografía de alta eficiencia (HPLC) usando una columna Rp 18 para determinar la composición de ácido oleico, linoléico y  $\alpha$ -linolénico libres en aceites de origen vegetal.

Se determinó la linealidad del método utilizando estándares de los ácidos  $\alpha$ -linolénico (C18:3), linoleico (C18:2) y oleico (C18:1) con pureza  $\geq 99\%$ , preparando curvas de calibración con concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 mg/L. Las curvas de calibración obtenidas presentaron un coeficiente de correlación superior a 0,995.

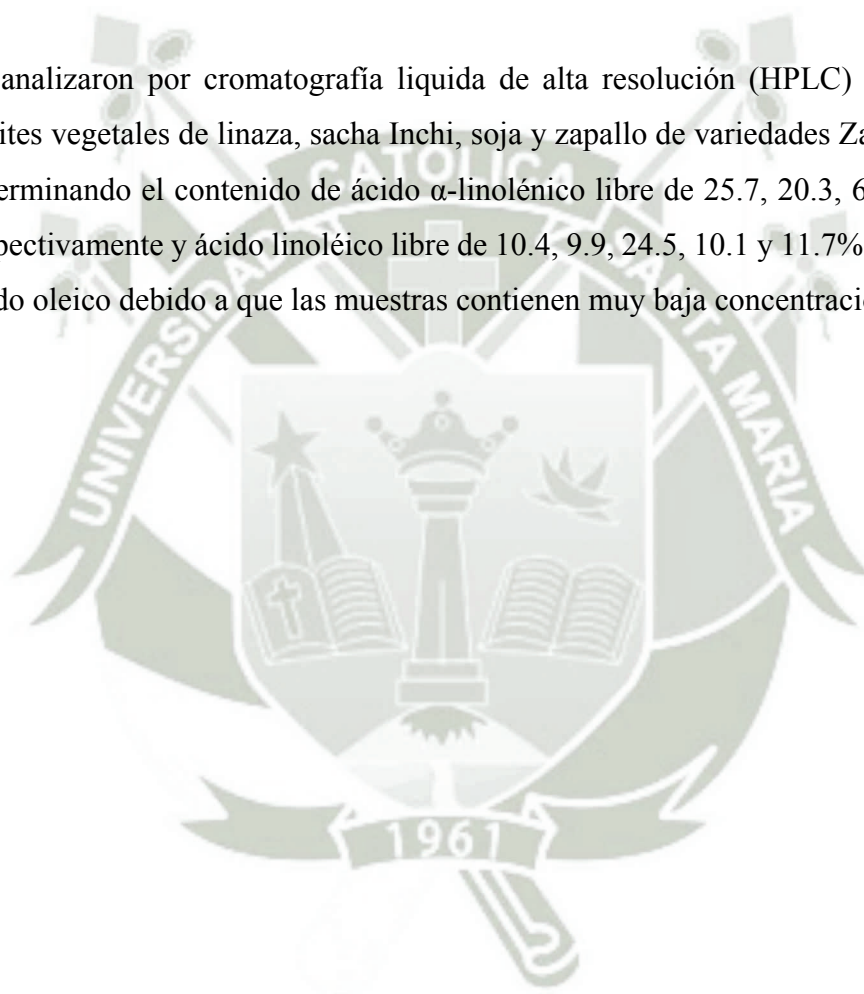
Se determinó el límite de detección y de cuantificación utilizando los estándares de cada ácido graso poliinsaturado en concentraciones inferiores a la curva de calibración como son 25, 50 y 75 mg/L. Las concentraciones del límite de cuantificación fueron de 2.84, 2.39 y 5.65 mg/L para los ácidos  $\alpha$ -linolénico, linoleico y oleico, respectivamente. La concentraciones para límite de detección fueron de 7.76, 7.44 y 23.72 mg/L para los ácidos  $\alpha$ -linolénico, linoleico y oleico respectivamente.

La precisión se determinó por medio de la repetitibilidad y reproducibilidad. La repetitibilidad se evaluó con 6 muestras de aceite de sacha Inchi extra virgen en un mismo día, por un mismo analista y con el mismo instrumento de medición. La reproducibilidad se evaluó en 6 días diferentes, diferente analista y diferente instrumento. Los coeficientes de variación obtenidos en repetitibilidad y reproducibilidad para los ácidos grasos se ajustaron a la norma de la AOAC, y la USP. El coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) para los ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico fueron de 1.28, 1.24% para repetitibilidad, 0.769 y 0.723% para reproducibilidad respectivamente, cumpliéndose con lo indicado por la USP que

sugiere que el RSD debe ser menor a 2.7 %. El cociente repetibilidad/reproducibilidad fue de 1.7 para el ácidos  $\alpha$ -linolénico y 1.9 para el ácido linoléico, estando dentro del rango establecido por la AOAC que es de 1.5 a 2.

La exactitud se evaluó a través de la determinación de la recuperación en una muestra de aceite sin y con fortificación por adición de los estándares de ácidos  $\alpha$ -linolénico (C18:3), linoleico (C18:2) y oleico (C18:1). Se obtuvieron valores de recuperación entre 100.5 y 110.6%.

Se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 5 muestras de aceites vegetales de linaza, sacha Inchi, soja y zapallo de variedades Zambo y Macre, determinando el contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico libre de 25.7, 20.3, 6.0, 2.6 y 2.3% respectivamente y ácido linoléico libre de 10.4, 9.9, 24.5, 10.1 y 11.7%. No se detectó ácido oleico debido a que las muestras contienen muy baja concentración del mismo.



## SUMARY

Previous studies reported by agencies such as FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) suggests that consumption of oleic, linoleic and  $\alpha$ -linolenic acid, may be related to the prevention of cardiovascular disease, cancer, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, asthma etc..

The objective of the present work was to validate and to implement an analytical methodology for high-efficiency chromatography (HPLC) using a column Rp 18 to determine the composition of free polyunsaturated fatty acids in vegetable oils.

Linearity of the method was determined using standards of acids  $\alpha$ -linolenic (C18: 3), linoleic (C18: 2) and oleic (C18: 1), with  $\geq 99\%$  purity, the calibration curves was prepared with concentrations of 100, 150, 200, 250 and 300 mg/L. The calibration curves showed a correlation coefficient greater than 0.995.

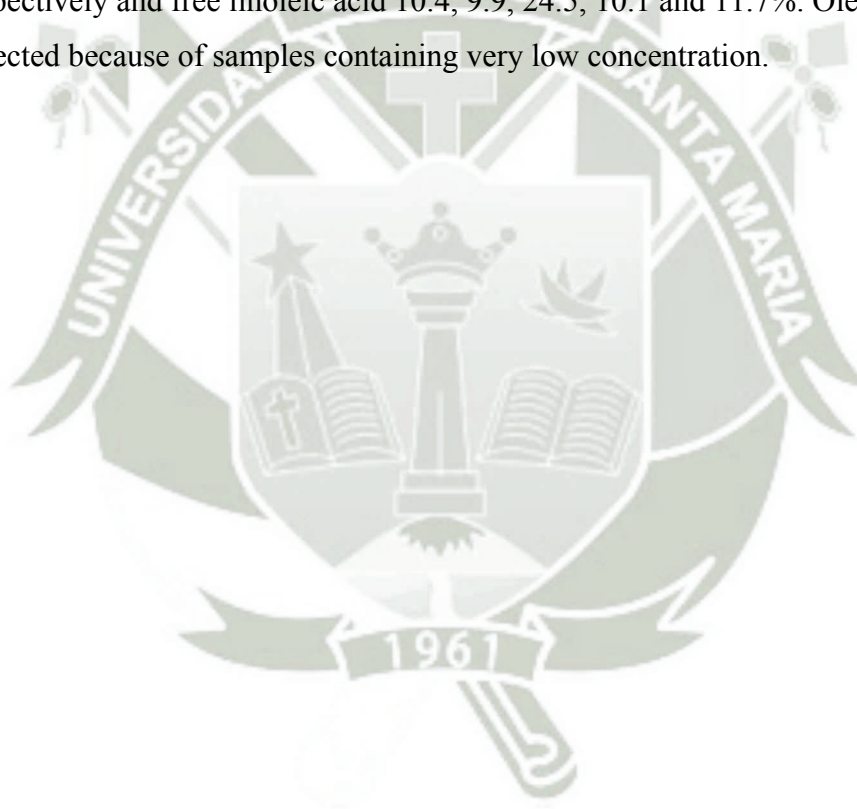
The limit of detection and quantitation was determined using standards each polyunsaturated fatty acid at concentrations below the calibration curve such as 25, 50 and 75 mg/L. The quantification limit concentrations were 2.84, 2.39 and 5.65 mg/L for the  $\alpha$ -linolenic acid, linoleic and oleic acid, respectively fulfilled as indicated by the USP suggesting that the RSD must be less than 2.7%. The detection limit concentrations were 7.76, 7.44 and 23.72 mg/L for the  $\alpha$ -linolenic acid, linoleic and oleic acid, respectively; still within the range established by the AOAC that is 1.5 to 2.

The precision is determined by means of repeatability and reproducibility. The repeatability was evaluated 6 samples Sacha Inchi oil extra virgin in one day, by the same analyst with the same measuring instrument. Reproducibility was assessed on 6 different days, different analyst and different instrument. Variation coefficients obtained repeatability and reproducibility for fatty acids was adjusted to the standard AOAC and USP. The coefficient of variation (CV) or relative standard deviation

(RSD) for  $\alpha$ -linolenic acid and linoleic acid were 1.28, 1.24% for repeatability, 0.769 and 0.723% for reproducibility, respectively. The ratio repeatability / reproducibility was 1.7 for the  $\alpha$ -linolenic acid and 1.9 for linoleic acid.

Exactitude is assessed by determining the recovery of an oil sample, with and without fortification by standards adding  $\alpha$ -linolenic acid (C18: 3), linoleic (C18: 2) and oleic (C18: 1). Recovery values were obtained between 100.5 and 110.6%.

Were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) 5 samples of vegetable oils, linseed oil, Sacha Inchi, soybeans and pumpkin varieties and Macre Zambo, concentration determining  $\alpha$ -linolenic acid free 25.7, 20.3, 6.0, 2.6 and 2.3 % respectively and free linoleic acid 10.4, 9.9, 24.5, 10.1 and 11.7%. Oleic acid was not detected because of samples containing very low concentration.



## INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos, son ácidos carboxílicos de cadena hidrocarbonada de longitud y grado de insaturación variable, que pueden estar libres y esterificados al glicerol en aceites. Por el número de dobles enlaces se clasifican en ácidos grasos monoinsaturados (presentan un doble enlace) como el del ácido oleico y poliinsaturados (presentan de dos a más dobles enlaces) como el ácido linoléico y  $\alpha$ -linolénico, estos últimos son considerados esenciales ya que el cuerpo humano no puede sintetizarlos y se deben ingerir con los alimentos <sup>(30, 76)</sup>.

El aceite vegetal puede provenir de varios frutos o semillas, entre ellos: aceituna (fruto del olivo), soya, palma (tanto del mesocarpio del fruto como de la semilla), sésamo o ajonjolí, girasol, arroz, maíz, lino, almendra, nuez, semillas de uva, semillas de amapola, semillas de zapallo, etc. <sup>(11)</sup>.

Los aceites vegetales contienen un largo número de componentes que pueden ser clasificados en fracciones saponificables e insaponificables. Alrededor del 98 % de aceites esta mayormente constituido de ácidos grasos y glicerol presentes en monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. Estos aceites vegetales de acuerdo a los procesos de extracción, almacenamiento, hábitat, clima, altura, etc. pueden presentar diversos niveles de ácidos grasos (palmítico, mirístico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) <sup>(23)</sup>.

Actualmente la demanda de aceites vegetales se incrementa por que contienen altos niveles de ácido oleico, linoléico y  $\alpha$ -linolénico. Organismos como la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) sugiere que podrían estar relacionadas con la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes mellitus, artritis reumatoide, asma, etc. <sup>(55)</sup>. Por lo cual existen normas como:

- i. **El Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)** que vela por la inocuidad de los alimentos y así mejorar los procesos de elaboración haciendo que los alimentos sean seguros, eficientes y eficaces para reducir reclamos, devoluciones, reprocesos y rechazos.

- ii. Para poder conocer la cantidad de los ácidos grasos presentes en aceites es necesario métodos rápidos, sencillos y de bajo costo para poder determinarlos, así es como los laboratorios de control de calidad tienen como requisito validar los métodos analíticos como lo exige la **Norma Técnica Peruana NTP-ISO/IEC 17025**, con fin de garantizar la precisión, exactitud, sensibilidad y reproducibilidad, garantizando la calidad de los ensayos y resultados.

Existen diversos métodos analíticos empleados para la determinación de ácidos grasos, el más conocido es la determinación por cromatografía de gases (GC).

Estudios previos aportan que los ácidos grasos (ácido oleico  $\omega$ -9, ácido linoléico  $\omega$ -6 y ácido  $\alpha$ -linolénico  $\omega$ -3) que pueden ser determinarlos por HPLC a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 205 a 208 nm <sup>(66, 23)</sup>.

El desarrollo del método analítico usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la determinación de ácidos grasos insaturados (presencia de dobles enlaces), ofrece las siguientes ventajas respecto al método por Cromatografía de Gases (GC) <sup>(23, 66)</sup>:

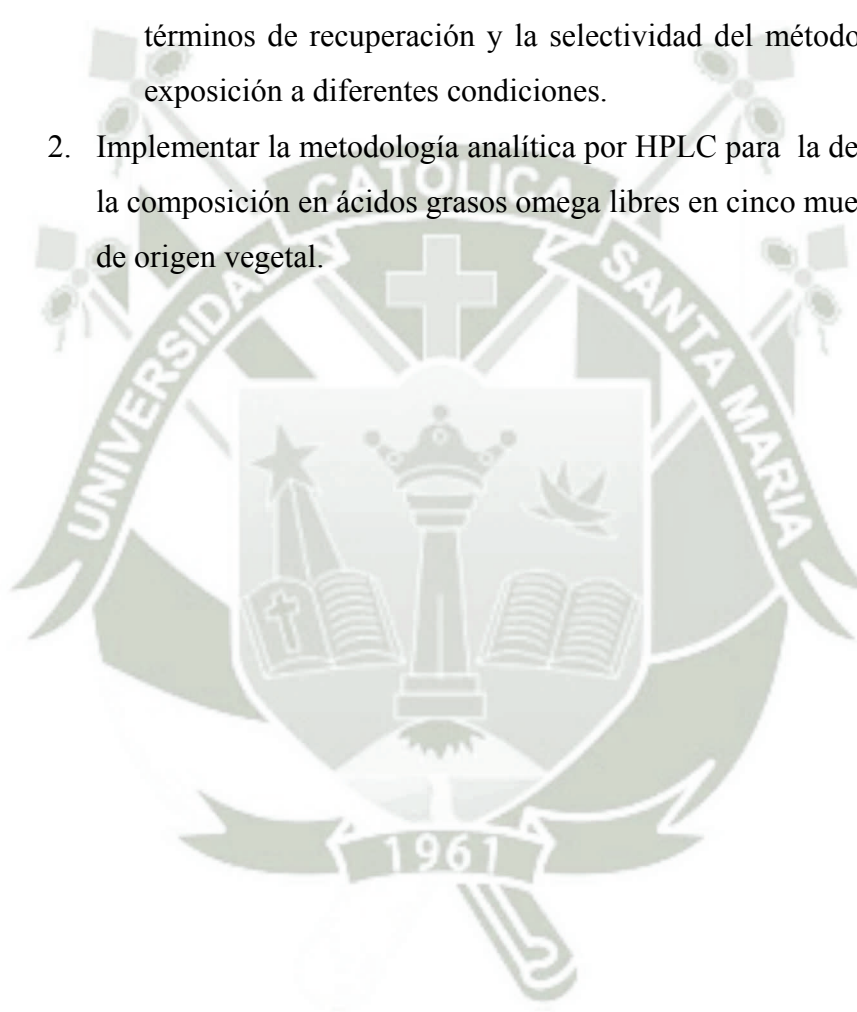
- i. Reduce el riesgo de isomerización de los ácidos insaturados.
- ii. No se derivatizan.
- iii. Es más barato.

Estas ventajas justifican la aplicación de la metodología analítica por HPLC.

## OBJETIVOS

El presente trabajo pretende alcanzar los siguientes objetivos:

1. Validar el método analítico usando instrumentos calibrados mediante la aplicación de parámetros de desempeño:
  - ✓ Determinar la linealidad, de método mediante una curva de calibración, sensibilidad, límite de detección y cuantificación, precisión del método a partir de la reproducibilidad y repetitibilidad, exactitud del método en términos de recuperación y la selectividad del método a partir de su exposición a diferentes condiciones.
2. Implementar la metodología analítica por HPLC para la determinación de la composición en ácidos grasos omega libres en cinco muestras de aceites de origen vegetal.



## HIPÓTESIS

Dado que los ácidos  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico son importantes para la nutrición humana, es probable validar una metodología analítica usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinarlos, sin derivatización a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 205 nm en muestras de aceite de origen vegetal.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

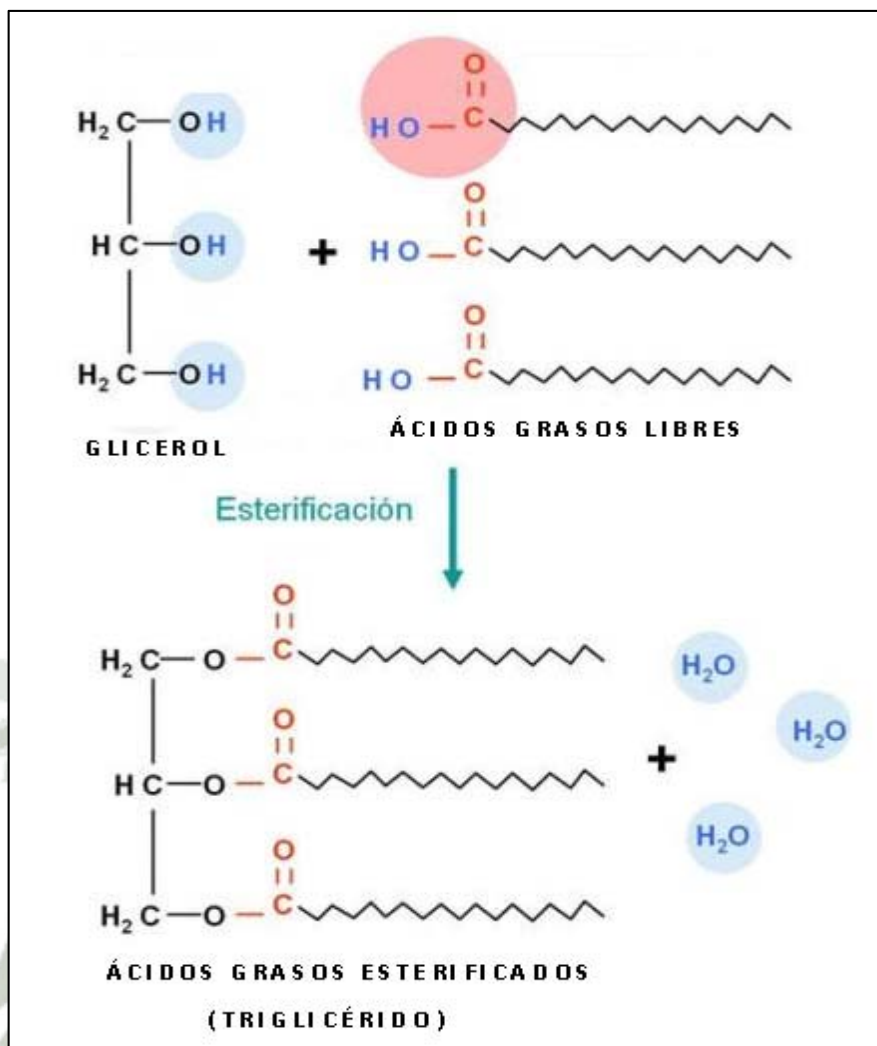
#### 1. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos que constan de cadenas hidrocarbonadas de longitud y grado de insaturación (dobles enlaces) variables. Los ácidos grasos se encuentran de formas libres y esterificados al glicerol como componentes de los lípidos ver Figura N° 01 <sup>(30, 76)</sup>. Los ácidos grasos pueden ser:

- i. Saturados: no presentan dobles enlaces como el ácido palmítico (Figura N° 02).
- ii. Insaturados: presentan dobles enlaces y se clasifican en:
  - a. Monoinsaturados: solo presentan un doble enlace como el ácido oleico (Figura N° 03).
  - b. Poliinsaturados: contienen dos o más dobles enlaces como el ácido linoléico y  $\alpha$ -linolénico (Figura N° 04 y 05 respectivamente).

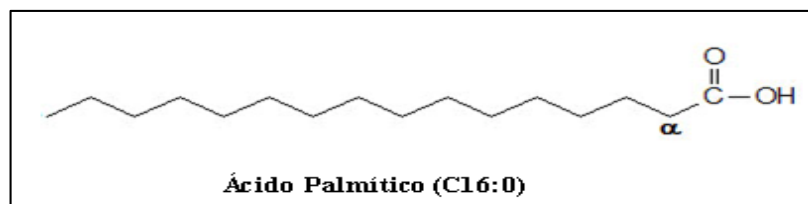
La configuración de los dobles enlaces de los ácidos grasos son casi siempre cis. Los dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados están separados entre sí por, al menos, un grupo metileno.

La abreviatura C18:0 indica que es un ácido graso con 18 carbonos (C<sub>18</sub>) sin dobles enlaces, mientras que C18:2 significa que tiene 2 dobles enlaces. En las Figuras N° 02 y 03 se muestra la estructura del ácido palmítico (C<sub>16</sub>, saturado) y el ácido oleico (C<sub>18</sub>, monoinsaturado) respectivamente <sup>(30)</sup>.



**Figura N° 01**

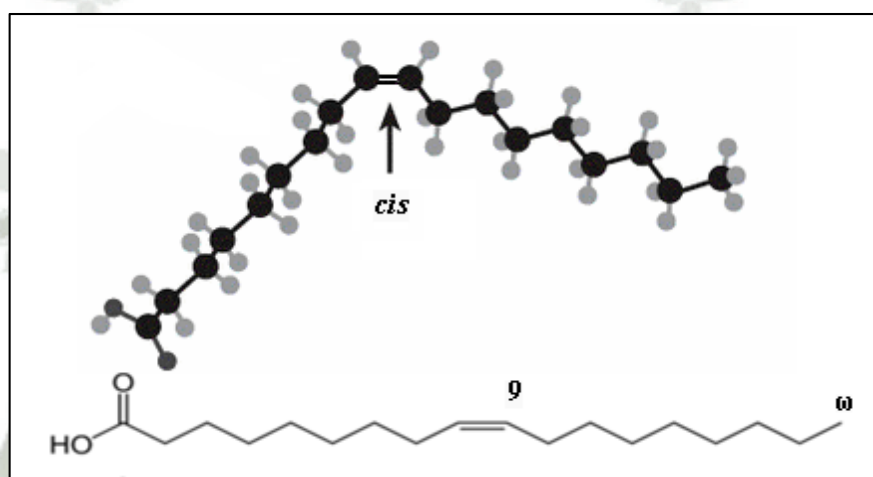
Los átomos de carbono de los ácidos grasos se numeran empezando por el extremo carboxilo. Los átomos de carbono 2 y 3 suelen denominarse  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente. Al átomo de carbono del grupo metilo del final de la cadena se le llama átomo de carbono omega ( $\omega$ ), se empieza a contar desde este, hasta el carbono donde se ubica el doble enlace y el número de carbonos contados es el número de omega del ácido graso, ejm. ácido  $\alpha$ -linolénico omega-3 ( $\omega$  3) (30).



**Figura N° 02**

### 1.1. ÁCIDO OLEICO

Es un ácido graso monoinsaturado (MUFA) conocido como omega 9, que es el más abundante en la dieta occidental.



**Figura N° 03.- Ácido oleico (C18:1), omega 9 (ω-9),  
Ácido cis-9-octadecenoico**

La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) establece criterios que deberían ser utilizados para juzgar los niveles y los grados de evidencia requeridos para concluir que la grasa total y los ácidos grasos afectan de manera importante a la salud y a las consecuencias de la enfermedad.

Se identificaron cuatro grados de evidencia

- i. Convinciente
- ii. Probable
- iii. Posible
- iv. Insuficiente

Dado el número limitado de ensayos controlados aleatorios sobre la grasa de la dieta y las enfermedades crónicas o la mortalidad se acordó que para que se formulara una recomendación dietética se necesitaba una evidencia de grado suficiente para ser “convinciente” o “probable”<sup>(55)</sup>.

#### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS (MUFA) SEGÚN LA FAO<sup>(55)</sup>.

- ✓ Hay evidencia convincente de que la sustitución de hidratos de carbono por MUFA aumenta la concentración del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).
- ✓ Hay evidencia convincente de que la sustitución de ácidos grasos saturados SFA (C12:0-C16:0) por MUFA reduce la concentración del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la relación colesterol total/colesterol HDL.
- ✓ Hay evidencia posible de que la sustitución de los hidratos de carbono por MUFA aumenta la sensibilidad a la insulina.
- ✓ Hay evidencia insuficiente para la relación entre el consumo de MUFA y las enfermedades crónicas tales como CHD (enfermedad coronaria) y cáncer.
- ✓ Hay evidencia insuficiente para la relación entre el consumo de MUFA, el peso corporal y el porcentaje de adiposidad.
- ✓ Hay evidencia insuficiente para la relación entre el consumo de MUFA y el riesgo de diabetes.

La determinación de la ingesta de MUFA es peculiar porque se calcula por diferencias, por ejemplo:  $MUFA = \text{Ingesta total de grasa (E\%)} - \text{ácido graso saturado (SFA) (E\%)} - \text{ácido graso poliinsaturado (PUFA) (E\%)} - \text{ácidos grasos trans (TFA) (E\%)}$ . Siendo **E % el porcentaje de energía**.

Por tanto, la ingesta de MUFA puede resultar muy variable dependiendo de la ingesta total de grasa y de las características de la grasa de la dieta.

## 1.2. ÁCIDO LINOLÉICO (AL)

Es un ácido graso poliinsaturado (PUFA) omega 6 que contiene dos dobles enlaces. Es considerado esencial debido a que el organismo humano no es capaz de sintetizarlo y por ello se sugiere ingerirlos en los alimentos.

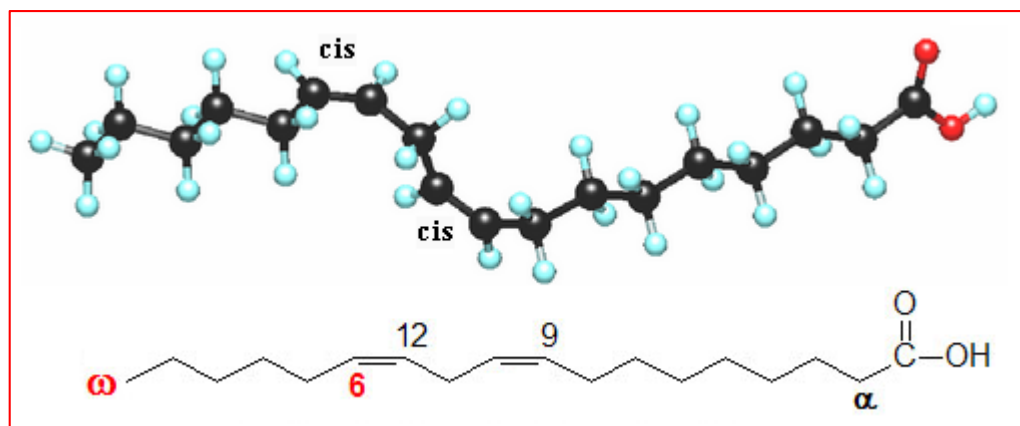


Figura N° 04.- Ácido linoléico (C18:2), omega 6 ( $\omega$ -6)

Ácido cis, cis-9,12-octadecadienoico.

## 1.3. ÁCIDO $\alpha$ -LINOLÉNICO (ALA)

Es un ácido graso poliinsaturado (PUFA) omega 3 que contiene tres dobles enlaces. Así como el ácido linoléico es también considerado esencial.

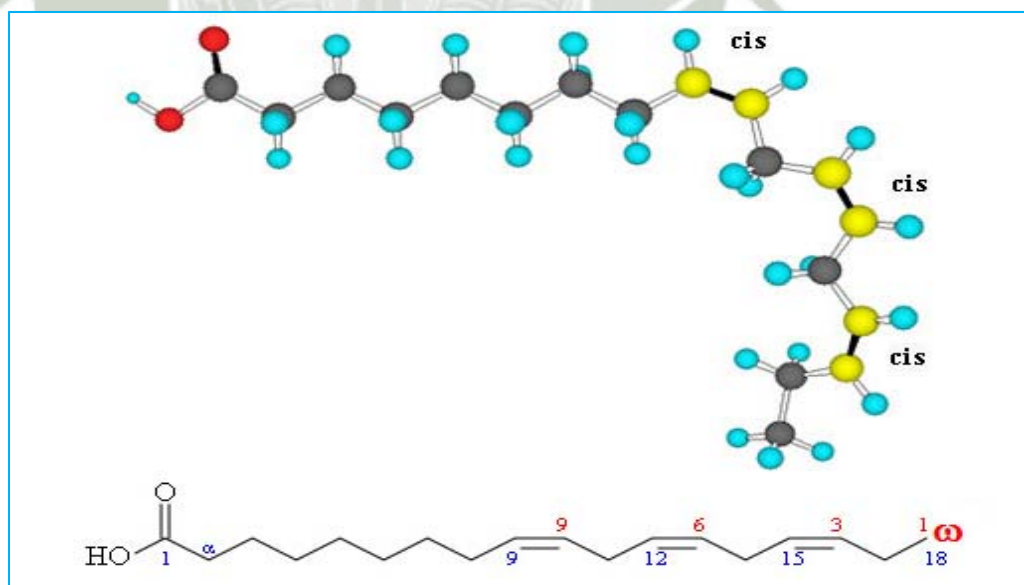


FIGURA N° 05.- Ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3), omega 3 ( $\omega$ -3),

Ácido cis, cis, cis-9, 12, 15-octadecatrienoico

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFA) SEGÚN LA FAO <sup>(55)</sup>.

- ✓ Hay una evidencia convincente de que los ácidos linoleico (LA) y alfa-linolénico (ALA) son esenciales ya que no pueden ser sintetizados por los humanos.
- ✓ Hay una evidencia convincente de que la sustitución de ácidos grasos saturados SFA por PUFA disminuye el riesgo de CHD (enfermedad coronaria).
- ✓ Hay una evidencia convincente y suficiente a partir de estudios experimentales para establecer una ingesta aceptable que cubra las necesidades de los ácidos grasos esenciales linoleico (LA) y alfa-linolénico (ALA).
- ✓ Hay una evidencia posible de que los PUFA afectan al riesgo de alteraciones en los índices relacionados con el síndrome metabólico.
- ✓ Hay una evidencia posible de que existe relación entre la ingesta de PUFA y el riesgo de diabetes.
- ✓ Hay una evidencia insuficiente para establecer una relación entre la ingesta de PUFA y el cáncer.
- ✓ Hay una evidencia insuficiente para relacionar la ingesta de PUFA, el peso corporal y el porcentaje de adiposidad.

Los valores mínimos de ingesta para los ácidos grasos esenciales con el fin de prevenir los síntomas de deficiencia se estiman, a un nivel convincente, como 2.5%E de LA más 0.5%E de ALA.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA LA INGESTA DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS $\omega$ -3 SEGÚN LA FAO <sup>(55)</sup>.

Las evidencias disponibles indican que la ingesta de 0.5-0.6%E de ácido alfa-linolénico (ALA) diaria previene los síntomas de deficiencia. La ingesta total de ácidos grasos  $\omega$ -3 se sitúan entre 0.5 y 2%E en tanto que los requerimientos mínimos de ALA (>0.5%E) para adultos previenen los síntomas de deficiencia.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS $\omega$ -6 SEGÚN LA FAO <sup>(55)</sup>.

Se reconoció que se dispone de muy escasa cantidad de datos obtenidos en humanos para establecer una estimación cuantitativa precisa de los requerimientos de ácido linoleico (LA) para prevenir su deficiencia; por tanto, se recomienda un intervalo de requerimientos en vez de una media. Los estudios en animales y en humanos demostraron que la prevención de los signos de deficiencia (por ejemplo, los que ocurren en las ratas: reducción de crecimiento, descamación en la piel y necrosis en la cola) se producen cuando el ácido linoleico proporciona 1-2% de la energía total. Por tanto, se propuso un requerimiento medio estimado (EAR) del 2%E y una ingesta adecuada (AI) de 2-3%E.

Hay evidencia insuficiente para establecer cualquier relación entre el consumo de PUFA  $\omega$ -6 y el cáncer.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA LA RELACIÓN $\omega$ -6/ $\omega$ -3 SEGÚN LA FAO <sup>(55)</sup>.

Basándose en la evidencia y en las limitaciones conceptuales, no parece razonable hacer recomendaciones específicas para la relación  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3, o la relación LA a ALA siempre que las ingestas de ambos tipos de ácidos grasos se sitúen dentro de las recomendaciones establecidas.

## 2. ACEITES Y GRASAS COMESTIBLES

Productos de origen animal o vegetal, o sus mezclas, que reúnan las características y especificaciones de la Reglamentación Técnica Sanitaria, y cuyos componentes principales son glicéridos de los ácidos grasos, pudiendo contener otras sustancias en proporciones menores.

Por su naturaleza se clasifican de la siguiente manera:

- ✓ ORIGEN VEGETAL: Los que se obtienen de frutos o semillas oleaginosos.
- ✓ ORIGEN ANIMAL: Los que se obtienen de los depósitos adiposos de determinados animales.

### 3. ACEITE VEGETAL

El aceite vegetal es un compuesto orgánico obtenido a partir de semillas u otras partes de las plantas. Como todas las grasas está constituido por glicerina y tres ácidos grasos.

El aceite vegetal puede provenir de varios frutos o semillas, entre ellos: aceituna (fruto del olivo), soya, palma (tanto del mesocarpio del fruto como de la semilla), sésamo o ajonjolí, girasol, arroz, maíz, lino, cáñamo, almendra, nuez, avellana, semillas de uva, semillas de amapola, semillas de zapallo <sup>(11)</sup>.

#### 3.1. SACHA INCHI *Plukenetia Volubilis L.*

El Sacha Inchi es una planta perenne oleaginosa nativa de la región amazónica del Perú <sup>(12)</sup>.

La planta ha sido cultivada por el pueblo indígena por siglos. El Sacha Inchi crece en tierra arcillosa y ácida. La planta puede crecer en el clima amazónico con temperaturas que van de 10 a 36 grados. Sin embargo, cuando la temperatura es demasiado alta, la planta perderá flores y frutos y cuando hay demasiada sombra, el crecimiento toma más tiempo y la producción será menor. Además, el Sacha Inchi necesita un suministro de agua constante para crecer. El Sacha Inchi puede crecer a una altura de dos metros <sup>(12)</sup>.

Las hojas tienen una longitud de 10 a 12 cm y una anchura de 8 a 10 cm. Florece cinco meses después de su plantación. Los frutos de la planta del Sacha Inchi son cápsulas que consisten de cuatro (hasta siete) lóbulos que contienen las semillas. Los frutos son verdes pero cuando maduran se convierten a marrones negruzcos (ver imagen N° 01) <sup>(86)</sup>.

Las semillas son de 1.5 a 2 cm en diámetro y pesan alrededor de 45 a 100 gramos. Tienen forma oval y un color marrón oscuro.



Imagen N° 01.-  
Semillas de sacha Inchi

**Clasificación taxonómica de la especie <sup>(86)</sup>**

**TABLA N° 01.- Clasificación taxonómica**

Reino	Plantae
Subdivisión	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Euphorbiaceae
Género	Plukenetia
Especie	P. volubilis L.
Sinónimos	Plukenetia perviana Muell
Nombres locales	Sacha Inchi, Sacha Peanut, Inca Peanut, Maní del Inca

Las semillas de Sacha Inchi consisten de 33% de proteínas y 54% de aceite. El aceite es una de las fuentes vegetales más grandes de Omega. El aceite contiene 46.0 % de Omega 3, así como 36.0% de Omega 6 y de 8.3% a 10% de Omega 9, tal como se presenta en la Tabla N° 02

**TABLA N° 02.-** *Composición de aceites grasos del aceite de Sacha Inchi*

Ácido Graso	Descripción	Porcentaje (%)
Palmítico	C 16:0	4%
Estearico	C 18:0	3%
Oleico ( $\omega$ -9)	C 18:1	10%
Linoleico ( $\omega$ -6)	C 18:2	36%
Alfa-linoleico ( $\omega$ -3)	C 18:3	46%

### 3.2. LINAZA *Linum usitatissimum*

El nombre botánico de la linaza es *Linum usitatissimum* de la familia Linaceae. La linaza es un cultivo flori azul muy versátil.

Las semillas que son utilizadas para alimentación humana y animal son cosechadas y posteriormente tamizadas a través de una malla fina, lo que resulta en un conjunto uniforme de semillas enteras (consideradas 99.9% puras<sup>(87)</sup>).

La semilla de linaza es plana y ovalada con un borde puntiagudo, mide entre 4 y 6 mm. Las semillas de linaza pueden variar de color desde café-oscuro hasta amarillo claro. El color de la semilla se determina a través de la cantidad de pigmento en la cubierta exterior de la semilla entre más pigmentación, más oscura es la semilla. El color de la semilla se modifica fácilmente a través de técnicas simples de cultivo<sup>(87)</sup>.

**Clasificación taxonómica de la especie**

**TABLA N° 03.- Clasificación taxonómica**

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Linaceae
Género:	Linum
Especie:	<i>L. usitatissimum</i>
Nombre binomial	<i>Linum usitatissimum</i>

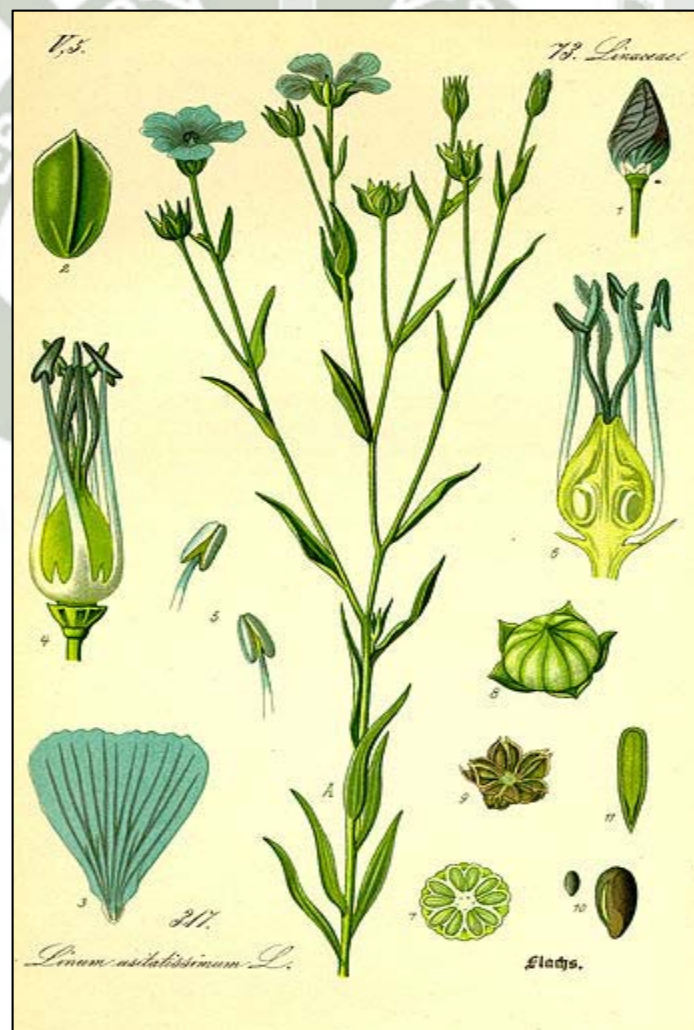


Imagen N° 02. - Linaza

La linaza es rica en grasa, proteína y fibra dietética. En promedio, la linaza café canadiense contiene 41% de grasa, 20% de proteína, 28% de fibra dietética total, 7.7% de humedad y 3.4% de ceniza.

El aceite de linaza contiene una mezcla de ácidos grasos (ver Tabla 04). Este producto es rico en ácidos grasos poliinsaturados, particularmente en ácido alfa-linolénico el cual es el ácido graso esencial omega 3 y el ácido linoléico, el cual es el ácido graso esencial omega 6 <sup>(88)</sup>.

**TABLA N° 04.-** *Composición del aceite de linaza, expresada como g sobre 100 g*

Ácidos grasos saturados		Ácidos grasos monoinsaturados	ácidos grasos poliinsaturados	
Palmítico (%)	Estearico (%)	Oleico (%)	Linoléico (%)	α-linolénico (%)
1.8 – 5.3	1.4 – 4.1	20.1 – 27.7	12.7 – 22.4	53.3– 57.3

### 3.3. SOJA *Glycine max*

La soja puede crecer desde 20 cm hasta 1 metro de altura .

Las vainas, tallos y hojas están cubiertas por finos pelos marrones o grises. Las hojas son trifoliadas. Las hojas caen antes de que las semillas estén maduras.

El fruto es una vaina pilosa que crece en grupos de 3-5, cada vaina tiene 3-8 cm de longitud y usualmente contiene 2-4 (raramente más) semillas de 5-11 mm de diámetro.

La soja se da en varios tamaños y la cáscara de la semilla es de color negro, marrón, azul, amarillo, verde o abigarrado. La cáscara del poroto maduro es dura, resistente al agua y protege al cotiledón e hipocótilo (o germen) de daños. Si se rompe la cubierta de la semilla, ésta no germinará. La cicatriz, visible sobre la semilla, se llama hilum (de color negro, marrón, gris y amarillo) y en uno de los extremos del hilum está el micrópilo, o pequeña apertura en la cubierta de la semilla que permite la absorción de agua para brotar <sup>(88)</sup>.



Imagen N° 03  
Semillas de Soja

**Clasificación taxonómica de la especie**

**Tabla N° 05.- Clasificación taxonómica**

Clasificación científica	
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Faboideae
Tribu:	Phaseoleae
Subtribu:	Glycininae
Género:	Glycine
Especie:	G. max

El aceite de soja es un aceite vegetal que procede del prensado de la soja. Este aceite es abundante en ácidos grasos poliinsaturados ver Tabla N° 06 <sup>(88)</sup>.

En los últimos años, y a consecuencia del florecimiento de la industria del biodiesel, se está potenciando el consumo de grasas vegetales <sup>(88)</sup>.

Tabla N° 06.- contenido de ácidos grasos.

Ácidos grasos	Contenido (%)
Ácido oléico	22.0
Ácido linoléico	54.0
Ácido $\alpha$ - linolénico	7.5

### 3.4. ZAPALLO *Cucurbita máxima Dutch*

El zapallo pertenece a la familia de las cucurbitáceas, son plantas rastreras de tallos suculentos y grandes hojas que cubren el suelo, cuyo cultivo se remonta a los inicios de nuestra agricultura en el antiguo imperio inca <sup>(54)</sup>.

**Clasificación taxonómica <sup>(38)</sup>**

Reino:	Vegetal
División:	Angiospermas
Clase:	Dicotiledónea
Sub clase :	Sympetalas
Orden:	Cucurbitales
Familia:	Cucurbitáceas
Genero:	Cucurbita
Especie:	máxima
Nombre científico:	<i>Cucurbita máxima Dutch.</i>
Nombre común:	Zapallo

**Variedades**

**Macre**

Es la variedad más común que existe tanto en la costa como en la sierra. <sup>(38)</sup>.

**Zambo**

Crece en las quebradas de la sierra <sup>(54)</sup>.

**Composición fisicoquímica**

La composición de la pulpa de *Cucurbita máxima* fresca se ven en la Tabla N° 07.

**Tabla N° 07.- Composición de la semilla de *Cucurbita máxima* fresca.**

Composición química (g/kg)		Ácidos grasos (% grasa)	
Grasas	524	Ácido mirístico (14:00)	0.16
Carbohidratos	129.08	Ácido palmítico (16:00)	10.84
Proteínas	274.85	Ácido heptadecanoico (17:00)	0.18
Fibra	161.54	Ácido esteárico (18:00)	5.84
Ceniza	44.22	Ácido oleico (18:1)	14.83
Humedad	27.51	Ácido linoleico (18:2)	56.60
Aminoácidos (mg/kg)		Ácido araquídico(20:00)	0.36
Ácido aspártico	20.41	Ácido eicosanoico (20:1 $\omega$ -9)	0.07
Ácido glutámico	48.94	Ácido $\alpha$ -linolénico (18:3 $\omega$ -3)	0.24
Alanina	10.16	Ácido behénico (22:00)	0.09
Arginina	8.69	Ácidos grasos saturados	17.47
Fenilalanina	13.14	Ácidos grasos monoinsaturados	14.90
Glicina	16.47	Ácidos grasos poliinsaturados	56.84
Isoleucina	10.89	Tocoferoles (mg/kg)	
Histidina	16.51	$\alpha$ -Tocoferol	20.79
Leucina	19.11	$\gamma$ -Tocoferol	28.70
Lisina	9.94	$\beta$ -Caroteno	31.40
Metionina	4.96	$\beta$ -Criptoxantina	0.21
Prolina	10.05		
Serina	12.28		
Tirosina	4.85		
Treonina	6.86		
Valina	15.25		

#### 4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

## CONCEPTO

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), es una técnica de separación, usada principalmente para la separación y cuantificación de componentes de una muestra basado en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, exclusión por tamaño, según el tipo de fase estacionaria empleada <sup>(61)</sup>.

**La fase estacionaria:** se empaca o deposita en la columna.

Por lo general está constituida por un sólido poroso, con un tamaño de partícula muy pequeño, de superficie inerte. Este sólido está recubierto por una pequeña capa o película de un líquido <sup>(61)</sup>.

**La fase móvil:** pasa a través de la columna a una velocidad determinada y transporta la muestra.

Es un solvente de alto grado de pureza o mezcla de ellos <sup>(61)</sup>.

## CROMATOGRAFÍA

La HPLC ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del 70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea esté dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico.

La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel.

La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”.

Una definición tan general como esta puede sin embargo presentar restricciones, por ejemplo ante el desarrollo en la década del 60 de la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC) y la comercialización a partir de 1987 de este tipo de cromatógrafos, en los cuales la fase móvil no es ni un gas ni un líquido, sino un fluido supercrítico. Quizás por ello sea conveniente, sólo

relacionar la cromatografía con un método separativo y aceptar la definición de Guiddings: “un método de migración en zonas”, abriendo la mente ante los cambios que continuamente se producen.

La idea de la HPLC misma, siglas que se debieron a “High Pressure Liquid Chromatography” debieron ser cambiadas cuando los cromatografistas se dieron cuenta que la presión sólo constituía una herramienta que forzaba la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse por sí en una variable del sistema. Sin embargo, y ante la “universalidad” consumada del término “HPLC”, se decidió simplemente buscarle otro significado, resultando “High Performance Liquid Chromatography”<sup>(61)</sup>.

#### 4.1. FORMAS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

##### **Cromatografía liquido-sólido (LSC) o de adsorción.**

Este método emplea una fase estacionaria polar, típicamente silicagel, y una fase móvil no polar, por ejemplo el hexano, en general con el agregado de algún aditivo que provee selectividad<sup>(61)</sup>.

##### **Cromatografía liquido-liquido (LLC) o de partición**

En esta modalidad, las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos: uno es la fase móvil, y el otro la fase estacionaria, que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido, finamente dividido<sup>(61)</sup>.

##### **Cromatografía de fase ligada (BPC)**

Las virtudes de la LCC eran claras, tanto como sus limitaciones. Por ello resulta también razonable pensar que reemplazarlo el tipo de unión de la fase estacionaria a su soporte, haciéndola perdurable por medio de una unión química covalente, el éxito del material estaría asegurado. Así, prácticamente el 90 % de las separaciones cromatografías modernas estaría asegurado. Así, prácticamente el 90 % de las separaciones cromatográficas modernas efectúa sobre material químicamente modificado, el cual permite optar, según el reactivo empleado para su fabricación, entre materiales altamente hidrófobos o

altamente hidrofílicos, con un amplio rango de polaridad y de selectividad: octadecilo, octilo, hexilo, butilo, etilo, ciano, diol, fenilo, amino, nitro, amino cuaternario, resto sulfónico, etc. <sup>(61)</sup>.

### **Cromatografía de intercambio iónico (IEC)**

En este caso se emplean rellenos en los cuales la partícula está constituida por un polímero o por silicagel, en cada caso unido a un grupo funcional aniónico o catiónico (típicamente sulfónico para el intercambio de cationes, amonio cuaternario para el intercambio de aniones). La selección del tipo de grupo funcional permite escoger entre intercambiadores débiles y fuertes <sup>(61)</sup>.

### **Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)**

Esta modalidad emplea materiales de porosidad controlada, que funciona como un filtro o tamiz y clasifica las moléculas de la muestra según un orden decreciente de tamaño molecular (las más grandes son las primeras en eluir, y las más pequeñas son las últimas). Si se dispone de estándares apropiados, de peso molecular adecuado (proteínas para análisis de proteínas, dextranos para el ensayo de dextranos, etc.), puede evaluarse el peso molecular de un compuesto desconocido, o bien la distribución de pesos moleculares de un polímero <sup>(61)</sup>.

## **4.2. BASES DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.**

La cromatografía líquida es, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así el lugar donde se produce la separación, la columna, puede ser considerado el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se centra todo, ya que alrededor de él se monta un equipo de mayor o menor complejidad <sup>(61)</sup>.

El cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.

- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna. El detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector puede ser análoga y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

**Un gráfico**, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo (de elución).

**Un eluido o eluato**, el líquido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil, e idealmente, los componentes de la muestra separados <sup>(61)</sup>.

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de los componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menos afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (es decir, en salir de la columna) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes <sup>(61)</sup>.

### 4.3. PARTES

#### RESERVORIO DE LA FASE MÓVIL

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Se ubica en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de la gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones.

Puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier frasco de laboratorio de buena calidad (vidrio o polímero resistente) con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema.

Al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10  $\mu\text{m}$  de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba <sup>(61)</sup>.

#### TUBERIAS

La fase móvil empleada en HPLC debe circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, este con uno o más detectores conectados en serie, y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Es evidente que las tuberías deberán ser inertes, y de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico, resistentes a altas presiones <sup>(61)</sup>.

#### UNIONES

Las uniones permiten conectar las tuberías, y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico. La unión consiste en dos piezas de acople perfecto, la unión “macho”, consiste en una férula que se afirma a la tubería conectora y un tornillo que se ajusta a la unión “hembra”, presente en un conector o componente de un módulo, dejando un volumen interno libre al solvente prácticamente nulo <sup>(61)</sup>.

Las uniones deben reunir determinadas características, entre ellas:

- Deben ser inerte a fases móviles y muestras.
- Deben cerrar herméticamente.
- No deben contribuir en forma notable con el ensanchamiento de la banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos.

## BOMBA

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los micro-filtros/minutos para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas.

Básicamente existen dos tipos de bombas: las de pistón (bombas recíprocas) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa) <sup>(61)</sup>.

### Características de las bombas

- **Caudal.** Los equipos convencionales operan con caudales entre 0.1 y 10.0 mL/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi.
- **Exactitud en el caudal.** La exactitud en la medición del caudal se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el caudal real entregado. La importancia en la exactitud del caudal reside en la importancia que pueda darse a la exactitud en la determinación de los tiempos de retención de las sustancias a cuantificar.
- **Ruido.** El ruido (short-term) se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas recíprocas, y que conducen a variaciones en el caudal de solventes entregado en intervalos cortos de tiempo. Se origina en la detención (en intervalos de tiempo muy breves) del caudal del líquido durante los movimientos habituales de la bomba (apertura-cierre de válvulas o movimiento de los pistones). A pesar de que cierto nivel de ruido es habitual, deficiencias en el sistema de bombeo como válvulas tapadas, burbujas de aire ocluidas en los cabezales o sellos en mal estado intensifican notoriamente su valor. Este parámetro es de importancia crucial para asegurar resultados cuantitativamente válidos debido a que las áreas de los picos de HPLC varían cuando varía el caudal de solvente.

- **Deriva.** La deriva es un cambio continuo (positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos (típicamente durante horas). La deriva en el caudal conduce a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en períodos largos (por ejemplo toda la noche).
- **Sistema de corte.** Es conveniente que la bomba posea sistemas de corte de caudal cuando se superen valores límites de presión tanto superior como inferior. Este sistema de corte evita, en el primer caso, que excesos en la presión del sistema cromatográfico pueda dañar los componentes más sensibles como columnas y celda de los detectores. En el segundo caso permite detectar las posibles pérdidas de solvente o la incorporación de burbujas de aire al agotarse la fase móvil. Estos sistemas pueden tener una importancia vital si se utilizan equipos automáticos sin la ayuda de operador<sup>(61)</sup>.

## INYECTORES

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema<sup>(61)</sup>. El inyector debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Actualmente la totalidad de los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar.

## DETECTORES

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los detectores deben reunir ciertas características importantes, entre ellas:

- **Tener un amplio rango dinámico de respuesta.** El rango dinámico para un detector de LC está definido por la ASTM ( American Society for testing and materials) como el rango de concentraciones de una sustancia en análisis en al que un cambio en la concentración produce un cambio en la señal. Como deducirse, esto incluye tanto la respuesta lineal como no lineal <sup>(61)</sup>.
- **Poseer una respuesta lineal.** El detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentración. Se denomina rango lineal de un detector al rango de concentraciones que producen una respuesta lineal, este rango está incluido en el rango dinámico <sup>(61)</sup>.
- **No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.** El ensanchamiento de banda extracolumnar se refiere a la perdida de eficiencia no adjudicable a la columna si no a la construcción del equipo cromatográfico <sup>(61)</sup>.
- **Responder a todos los solutos.** La situación ideal es, obviamente, que el detector responda a todo tipo de solutos, pero esto no siempre es posible en HPLC debido a que para la detección deben obtenerse instrumentos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (la fase móvil) y un sólido (los analitos disueltos) <sup>(61)</sup>.
- **Tener la sensibilidad apropiada.** Habitualmente esta propiedad se contrapone con la universalidad de detección. Es decir que detectores que responden a todos los analitos en general poseen sensibilidades menores, y en contrapartida, detectores que poseen una alta sensibilidad no responden a todos los solutos <sup>(61)</sup>.

- **No afectarse por cambios de temperatura.** En lo posible los cambios de temperatura no deben modificar la señal emitida por los detectores. Esta característica no es válida para el detector de índice de refracción en el cual, para trabajos que demanden una sensibilidad media o alta debe termostalizarse para tener una línea base estable <sup>(61)</sup>.
- **Poseer una buena relación señal/ruido.** El ruido de un detector es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruido largos y cortos en un período de tiempo dado. Estas perturbaciones que se producen en la línea base del detector se deben a la electrónica propia del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica, o a fluctuaciones en el caudal <sup>(61)</sup>.
- **No destruir la muestra.** Esta propiedad es una característica de casi todos los detectores de HPLC (una excepción es el electroquímico) y resulta muy importante cuando se desea recolectar al analito aislado <sup>(61)</sup>.

### EL HORNO

Debe ser estables +/- 0.2%.

Debe contar con mecanismos de seguridad.

Las columnas deben ingresar fácilmente a su compartimiento.

Preferentemente debe conectarse el inyector dentro del horno <sup>(61)</sup>.

### SISTEMAS DE TOMA Y PROCESAMIENTO DE DATOS

El resultado del ensayo cromatográfico es la obtención de fracciones separadas de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar:

- **Registrador gráfico**, que convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.

- **Integrador**, que permiten no sólo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento para el cálculo de concentraciones.
- **Computadora**. Básicamente el integrador es una computadora de uso muy específico. En este punto nos referimos a una computadora de tipo personal que permita con el software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatógrafos. Como computadoras que necesitan señales digitalizadas, se necesita una interface analógica digital que convierta la señal analógica entregada por el detector <sup>(61)</sup>.

## 5. MÉTODO ANALÍTICO

### CONCEPTO

El método analítico se refiere a la forma de realizar el análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esta puede incluir a las preparaciones de la muestra, los estándares de referencia y los reactivos, uso de aparatos, generación de la curva de calibración, uso de la fórmula para los cálculos, etc.; pero no se limita sólo a ello <sup>(61)</sup>.

### FASES EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

El desarrollo lógico del método analítico transcurre en tres fases:

#### **Definición de las características y requerimientos que debe satisfacer el método analítico:**

Precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, coste, tipo de instrumentación necesaria, etc.

#### **Puesta a punto del método analítico:**

Desde los primeros estudios de tanteo con patrones hasta la utilización del método en muestras reales, pasando por la definición de los parámetros de idoneidad que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el método del análisis.

#### **Validación del método analítico:**

Esta tercera etapa permitirá conocer la fiabilidad del método para su aplicación rutinaria y, en combinación con las etapas anteriores, sus características de funcionamiento con consecuencias positivas para su rendimiento <sup>(61)</sup>.

### **5.1. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

#### **DEFINICIONES DE VALIDACIÓN**

Validación, es el acto mediante el cual, se reúne una serie de datos que permitan asegurar, por una parte, la fiabilidad y reproducibilidad de cualquier proceso, procedimiento, equipo y metodología empleados en la fabricación y control de un medicamento, y por otra parte, es comprobar y certificar, con evidencia documentada, que un método, sistema o proceso, cumple y se desarrolla tal como estaba previsto, dentro de intervalos definidos <sup>(61)</sup>.

#### **¿CUANDO ES NECESARIO VALIDAR UN MÉTODO DE ENSAYO?**

Un método de ensayo se valida cuando es necesario verificar que los parámetros ejecutados son los adecuados para resolver un problema analítico en particular. El laboratorio debe validar (Requisito 5.4.5.2 de la Norma NTP ISO/IEC 17025):

- Los métodos de ensayo no normalizados: Es aquel método de ensayo desarrollado por el propio laboratorio u otras partes no reconocidas. Por ejemplo: métodos de ensayo publicados o recopilados en revistas técnicas o textos; métodos de ensayo de fabricantes de bienes tales como equipos, kits de ensayo, instrumentos portátiles.

- Los métodos de ensayo modificados, ampliados o aplicados a un alcance diferente al originalmente establecido en la norma. (Se considera también un método de ensayo no normalizado)
- Cuando se requiera demostrar la equivalencia entre dos métodos de ensayo.

**La validación es necesaria porque:**

- Proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados <sup>(61)</sup>.
- Permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento.

**Este conocimiento y seguridad en el método analítico que ha sido validado se traduce en:**

- Disminución del número de fallos y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costes asociados.
- Cumplimiento de los plazos previstos de análisis.
- Optimización del método, por ejemplo, mejorando la característica de practicidad y posibilidades de automatización.

**Por otra parte, los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias legales:**

- Las Good Manufacturing Practice de los Estados Unidos indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados <sup>(61)</sup>.

**Requisitos de la validación:** Son tres los requisitos fundamentales:

- Aseguramiento de la calidad. La validación contribuye a garantizar la calidad y asegurar el mantenimiento de las propiedades de la calidad en un producto determinado.

- Demostración. Este aseguramiento debe ser mostrado mediante la fiabilidad y reproducibilidad del equipo, proceso, etc.
- Documentación. Esta demostración debe estar debidamente documentada con las pruebas efectuadas y los datos obtenidos referidos a las pruebas según el protocolo de validación <sup>(61)</sup>.

## 5.2. PARAMETROS ANALÍTICOS.

Las características de desempeño del método analítico se expresan en función de los siguientes parámetros analíticos:

### 5.2.1. ESPECIFICIDAD O SELECTIVIDAD:

La selectividad o especificidad, es la capacidad del método para evaluar únicamente el analito íntegro de forma exacta y específica, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra <sup>(61)</sup>.

### 5.2.2. LINEALIDAD E INTERVALO

#### DEFINICIÓN DE LINEALIDAD

La linealidad de un método analítico es su capacidad para demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales (o se convierten en directamente proporcionales mediante una transformación matemática bien definida) a la concentración del analito dentro de un rango dado <sup>(61)</sup>.

### 5.2.3. PRECISIÓN

La precisión de un método analítico, es el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples tomas de una muestra homogénea. La Precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico, bajo condiciones operativas normales <sup>(61)</sup>.

#### 5.2.4. EXACTITUD

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse a lo largo de todo un rango <sup>(61)</sup>.

#### 5.2.5. SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo <sup>(57)</sup>

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de *detección* y de *cuantificación*.

##### **Límite de detección**

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite.

Es la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límite solamente fundamenta que la cantidad del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad.

##### **Límite de cuantificación**

Es la cantidad menor del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas <sup>(61)</sup>.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MUESTRA

##### Muestras de estudio

Para el presente estudio se utilizaron cinco muestras de aceites vegetales obtenidas de supermercados y muestras registradas en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, ver Cuadro N° 01.

CUADRO N° 01: Muestras.

N°	ACEITE VEGETAL
1	Linaza
2	Sacha Inchi
3	Soja
4	Zapallo A (Zambo)
5	Zapallo B (Macre)

#### 2. AMBIENTE UTILIZADO

El siguiente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad (H-204 /205) de la Universidad Católica de Santa María en la ciudad de Arequipa.

#### 3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

##### Materiales

- ✓ Micropipetas de 50 y 1000 µl.
- ✓ Fiolas de 5, 10, 100, 250 y 500 ml.

- ✓ Pipetas volumétricas de 5, 10 25 y 50ml.
- ✓ Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 ml.
- ✓ Viales para HPLC.
- ✓ Vaso de Precipitados de 25, 50 y 100 ml.
- ✓ Espátulas.
- ✓ Probetas graduadas de 100 y 500 ml.
- ✓ Jeringas descartables de 5 y 10 ml.
- ✓ Membranas de filtración para HPLC.
- ✓ Baguetas.
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 100 ml.
- ✓ Puntas estériles.
- ✓ Matraz Kitasato de 1000 ml boca H29/32.
- ✓ Soporte de membrana con placa porosa H29/32.
- ✓ Embudo soporte de 300 ml.
- ✓ Pinza y papel aluminio.

#### **Reactivos**

- ✓ Agua destilada.
- ✓ Agua ultra pura.
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC (Merck).
- ✓ Metanol grado HPLC. (Merck).
- ✓ Ácido acético glacial p.a.
- ✓ Estándar de:
  - Ácido  $\alpha$ -linolénico con pureza  $\geq 99$  % (Sigma).
  - Ácido linoléico con pureza  $\geq 99$  % (Sigma).
  - Ácido oleico con pureza  $\geq 99$  % (Sigma).
- ✓ Hidróxido de Sodio 0.1 N.
- ✓ Ácido clorhídrico 0.1 N.
- ✓ Peróxido de Hidrogeno.

**Equipos:**

Los equipos utilizados en la presente investigación están calibrados y verificados.

**a. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución**

Marca: Merck Hitachi

Modelo: LaChrom

Equipado con los siguientes módulos:

- Detector DAD (Diode Array Detector) Merck Hitachi  
Modelo: L-2450  
N° Serie: 1726-011
- Columna Merck Lichrocar 250mm x 4mm RP-18(5um)
- Integrador Merck Hitachi
- Bomba programable Merck Hitachi  
Modelo: L-2130  
N° Serie: 17E01-036
- Organizador ELITE LaChrom  
Modelo: L -2000  
N° Serie: 17E16-034
- Software: Chromatography Data Station
- Software HPLC System Manager Version 4.1

**b. Balanza analítica**

Marca: OHAUS

Modelo: PIONNER

Sensibilidad: 0.0001 g

**c. Baño María regulable**

Marca: Sur Val

Modelo: 1185-20

**d. Ultrasonido**

Marca: BRANSON

Modelo: 2510

e. Bomba de vacío

Marca: Cole Palmer

Modelo: 7049-02

f. Purificador de agua: Easy pure II – RF Ultra pure water system, con una conductividad de 18 MΩ.

#### 4. MÉTODOS

##### MÉTODOS ANALÍTICOS

**Método Analítico para Determinar el Contenido de ácidos grasos omega libres (ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico) en muestras de aceite vegetal por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

Se tomaron un grupo de 5 muestras de aceites vegetales para la determinación de ácidos grasos omega libres, teniendo en consideración que todos los aceites se encuentran bajo las mismas condiciones de almacenamiento y todos son procesados de la misma manera.

##### Condiciones cromatográficas.

- Equipo: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución
- Columna: Rp-18 Merck Lichrocart 250mmx 4mm
- Sistema: Isocrático
- Longitud de onda: 205 nm
- Flujo: 1ml/min
- Tiempo de retención: aproximadamente, 3.2, 4.3, 6.3 min para los ácidos  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico respectivamente.
- Tiempo total de corrida: 10 minutos
- Fase móvil: Acetonitrilo 85 %; metanol 5 % y ácido acético 1%

##### PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

### **Ácido acético 1%**

Medir exactamente 5 ml de ácido acético glacial con una pipeta volumétrica en una fiola de 500 ml y disolver con agua ultra pura hasta enrasar.

### **Preparación de la mezcla disolvente**

En una fiola de 100 ml mezclar 85 volúmenes de acetonitrilo grado HPLC, 5 volúmenes de metanol grado HPLC y 10 volúmenes de la solución de ácido acético 1 %.

### **Preparación de la mezcla de estándares**

En una fiola de 10 ml pesar 10 mg de los 3 estándares de ácidos grasos omega, enrasar con la mezcla disolvente cubrir con papel aluminio y llevar al ultrasonido por 10 minutos, esta solución.

### **Validación del método analítico**

De acuerdo a los criterios sugeridos por International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) y la association of analytical communities AOAC y la Norma Técnica Peruana ISO/IEC 17025 se analizaran los siguientes parámetros.

- Linealidad
- Sensibilidad
- Precisión
- Exactitud
- Selectividad

### **LINEALIDAD**

Sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta en presencia de la matriz del producto.

### **Preparación de la mezcla de estándares**

En una fiola de 10 ml pesar 10 mg de cada uno de los estándares de ácidos grasos omega, cubrir con papel aluminio, enrasar con la mezcla disolvente y

someter al ultrasonido por 10 minutos, (concentración de la mezcla de estándares: 1000 mg/L o ppm).

### Preparación de la curva de calibración

Se preparó una solución stock con estándares de ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico correspondientes a una concentración de 1000 mg/L con mezcla disolvente hasta su completa disolución. A partir de esta solución se tomaron alícuotas de 500, 750, 1000, 1250 y 1500  $\mu$ l, llevando a cada una de ellas a Fiolas de 5 ml, enrasándolas con mezcla disolvente, obteniendo concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 mg/L respectivamente. Transferir estas soluciones a viales para HPLC y proceder a inyectar por duplicado.

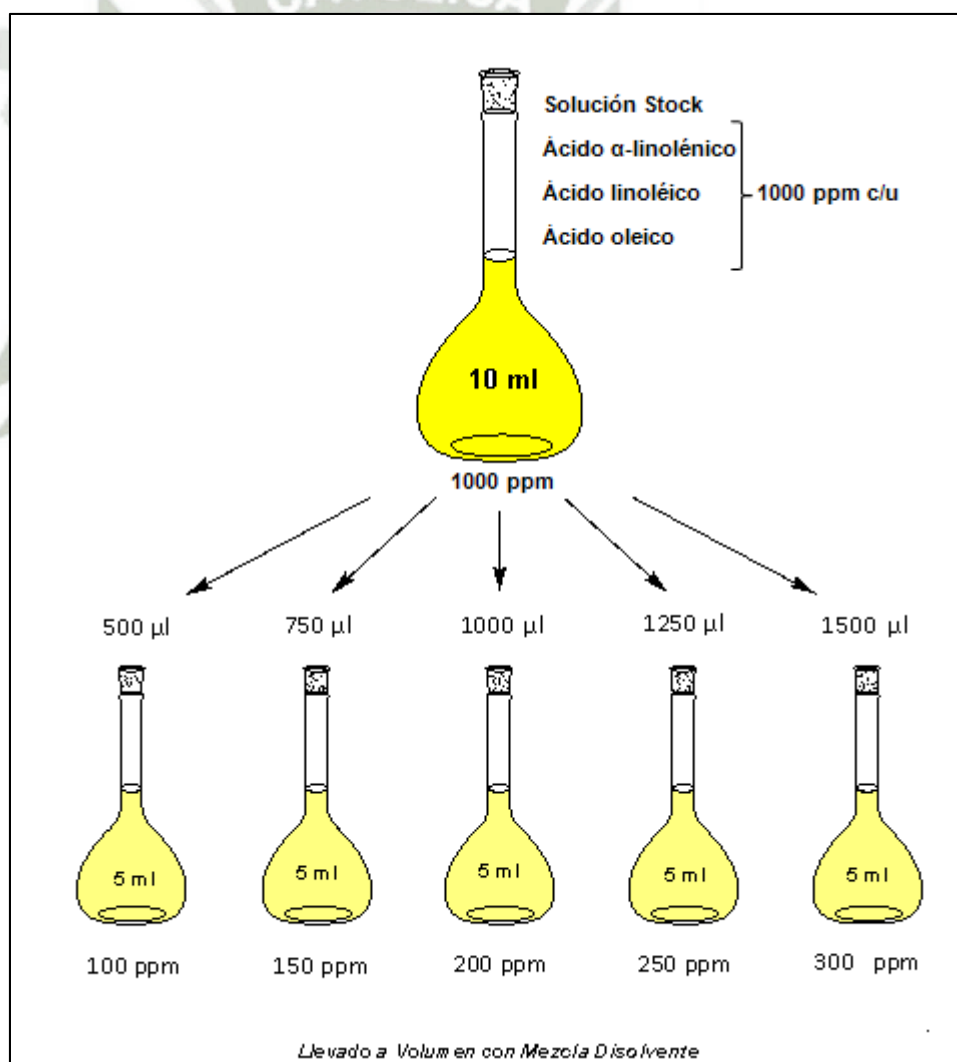


FIGURA N° 06.- Preparación de la curva de calibración

### Análisis Estadístico

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez. Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar, y se determina la curva de regresión  $Y = a + bx$ .

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo  $a$  y  $b$  los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente,  $n$  el número de mediciones,  $X_i$  la concentración e  $Y_i$ , el valor medido en el ensayo  $i$ , Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de la regresión en un intervalo de confianza dado ( $p = 0,05$ ).

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

Así:

El valor  $r = 1$  indica una recta perfectamente lineal,  $r = -1$  una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y  $r = 0$  la no correlación entre X e Y. En la práctica,  $r$  es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es  $r$  sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de  $t$  con  $n-2$  grados de libertad y se compara con el valor  $t$  calculado para el nivel de confianza requerido. Si el valor observado es mayor que el de la tabla, entonces se concluye que la correlación lineal es significativa con la probabilidad calculada.

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

El límite de confianza para el estimador de la pendiente (b) se calcula en función de su varianza.

$$S_{x,y}^2 = \frac{\sum Y_i^2 - a \sum Y_i - b \sum X_i Y_i}{n-2}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S(xy)^2}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}}$$

Luego, los límites de confianza de la pendiente corresponden a: Intervalo de confianza para:

$$b: b = b \pm t, S_b$$

Donde  $t$  es para  $n-1$  grados de libertad. Por su parte, el límite de confianza del estimador de la ordenada al origen ( $a$ ) se calcula en función de:

$$S_a = \sqrt{(S_b)^2 \frac{\sum X_i^2}{n}}$$

Intervalo de confianza para  $a$ :  $a = a \pm t, S_a$

Para pruebas de Disolución la ICH recomienda un +/- 20 % sobre el rango especificado.

### **SENSIBILIDAD**

#### **Preparación de la mezcla de estándares o solución stock**

En una fiola de 10 ml pesar 10 mg de cada uno de los estándares de ácidos grasos omega, cubrir con papel aluminio, enrasar con la mezcla disolvente y someter al ultrasonido por 10 minutos, (concentración de la mezcla de estándares: 1000 ppm).

#### **Preparación de los 3 puntos por debajo de la curva de calibración.**

En fiolas de 5 ml transferir 125, 250 y 350  $\mu$ l de la solución stock, enrasar con la mezcla disolvente obteniéndose concentraciones de 25, 50, 75 ppm respectivamente, cubrir con papel aluminio, someter al ultrasonido por 10 minutos. Transferir estas soluciones a viales para HPLC y proceder con la lectura.

#### **Análisis estadístico**

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de **detección** y de **cuantificación**.

Límite de **detección** corresponde, según la, USP XXX, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.),

Límite de **cuantificación** corresponde, según la misma referencia, a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración.

### **Análisis Estadístico**

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado:  $b$

Se obtiene otra curva de calibración, leyendo cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco:  $Y_{bl}$

Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs  $s$  y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado  $S_{bl}$  correspondiente a la desviación estándar del blanco,

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para  $n$  medidas individuales como:

**Límite de Detección:**

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

**Límite de Cuantificación:**

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

**PRECISIÓN**

Es la dispersión de la medida alrededor de un valor medio.

Es una medida de la REPRODUCIBILIDAD del método.

Este ensayo se analiza con el mismo lote utilizado para la repetibilidad.

**Preparación del ensayo**

En 6 fiolas de 10 ml transferir 200 µl de una muestra de aceite vegetal y enrasar inmediatamente con la solución disolvente, cubrir con papel aluminio, someter al ultrasonido por 10 minutos, filtrar y proceder a leer por HPLC.

**Análisis estadístico**

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medido o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar,  $\sigma$ , este por  $s$  o más comúnmente como la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde  $n$  es el número de medidas, es el valor medido en el ensayo  $i$  y el estimador de la medida de la población  $\mu$  calculado como:

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

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la medida). La precisión de un método deberá estudiarse sobre:

El sistema, evaluando la dispersión de al menos 6 lecturas del estándar. La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista diferente día, diferente instrumento). Así la USP indica una DSR del sistema de no más de 2%, leyendo 5 veces una solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1% e incluso menores.

Horwitz ha encontrado una ecuación empírica que relaciona la DSR de un método dado con la concentración de analítico en la muestra. Para ello, se recopilaron resultados de unos 150 ensayos ínter laboratorios de la AOAC comprendiendo, por lo menos, 5 metodologías diferentes (cromatografía,

absorción atómica, espectrofotometría, bioensayos) la relación hallada es la siguiente,

$$DSR (\%) = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Donde C es la concentración del analito expresada en potencias de 10

Así la concentración de analito es 1 ppm la RSD será:

$$DSR = 2^4 = 16\%$$

Y si la concentración de analito es 1 ppb la DSR será:

$$DSR = 2^{5.5} = 45\%$$

En el mismo trabajo, Horwitz reportó que la DSR entre laboratorios tiende a disminuir al aumentar la experiencia analítica hasta un valor que se aproxima bastante al estimado por cálculo.

#### **Límites de confianza:**

En muchos casos debe indicarse el intervalo de confianza de la medida, es decir, el rango en el cual puede definirse la probabilidad de que éste "capture" con la probabilidad indicada el parámetro  $\mu$  <sup>(76)</sup>.

Los criterios pueden ser varios, pero deberá dejarse constancia del empleado: la media  $\pm$  2 desviaciones estándar (correspondiente al 95% de las medidas en una distribución normal o gaussiana), la media  $\pm$  3 desviaciones estándar (99,7% de las medidas para el mismo tipo de distribución) o preferentemente, cuando el número de muestras es pequeño (menor de 30), las medidas independientes, y la distribución normal, puede calcularse de acuerdo a la distribución t de Student según.

$$\bar{X} - \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Donde t es el valor "t de Student", tabulado para n mediciones con  $v = n-1$  grados de libertad y para varios niveles de significación (el nivel más empleado es  $p = 0,05$ , correspondiente a un intervalo de confianza del 95%).

### **Exactitud (Error sistemático o sesgo)**

Mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero.

Para este estudio se trabaja con los mismos estándares y muestras preparadas para determinar la Linealidad del método.

### **Preparación del ensayo**

En fiolas de 5 ml, a cada muestra sometida al ensayo de precisión fueron enriquecidas de la siguiente manera:

Añadir a cada fiola con 150 ppm de ácido linoléico, 105 ppm de ácido  $\alpha$ -linolénico y para el caso del ácido oleico agregar primero 20 ppm para poder determinar el aproximado de trazas, para luego añadirle 150 ppm. Añadiéndose para cada fiola 105, 150 y 170 ppm de ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico, oleico respectivamente. Proceder a leer por HPLC.

### **Análisis Estadístico**

La exactitud o bien podríamos llamarla "Inexactitud". Debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia, Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100%.

En el análisis de trazas (micro componentes), no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran habituales valores de recuperación entre el 60 y 80 %. Para determinarlo puede utilizarse un ensayo t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y

calculando el t experimental, que se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido, generalmente  $p = 0,05$ .

En ese caso el valor t se calcula como:

$$t_{obt} = \frac{[100 - R]\sqrt{n}}{RSD}$$

Siendo R la recuperación porcentual

Si  $t_{obt} < t_{tabla}$ , no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada.

### **SELECTIVIDAD**

Este parámetro permite determinar si el método es capaz de detectar únicamente el principio activo en una matriz determinada.

### **Preparación de las Soluciones de trabajo**

#### Solución sometida a Hidrólisis Acida

Tomar 1 mililitro de la solución stock de los estándares y llevarla a un tubo de ensayo, luego adicionar 1 mililitro de Ácido Clorhídrico 0,1 N.

#### Solución sometida a Hidrólisis Alcalina

Tomar 1 mililitro de la solución stock de los estándares y llevarla a un tubo de ensayo, luego adicionar 1 mililitro de Hidróxido de Sodio 0,1 N.

#### Solución sometida a Fotólisis

Tomar 1 mililitro de la solución stock de los estándares y llevarla a un tubo de ensayo, luego adicionar 1 mililitro de agua destilada.

#### Solución sometida a Oxidación

Tomar 1 mililitro de la solución stock de los estándares y llevarla a un tubo de ensayo, luego adicionar 1 mililitro de peróxido de hidrógeno.

#### Solución sometida a Hidrólisis

Tomar 1 mililitro de la solución stock de los estándares y llevarla a un tubo de ensayo, luego adicionar 1 mililitro de agua destilada.

Al finalizar la preparación de las soluciones llevar los tubos de ensayo a Baño María durante 1 hora, a excepción del tubo para el ensayo de fotólisis que será sometido a UV durante 1 hora. Luego dejar enfriar, filtrar y proceder a inyectar.

#### **Determinación del contenido de ácidos omega libres en muestras de aceite vegetal por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

##### **Preparación de la mezcla disolvente**

En una fiola de 100 ml mezclar 85 volúmenes de acetonitrilo grado HPLC, 5 volúmenes de metanol grado HPLC y 10 volúmenes de la solución de ácido acético 1 %.

##### **Procedimiento**

Medir de 0.2 a 0.5 ml de aceite vegetal una fiola de 10 ml, enrasar con la mezcla disolvente, cubrir las fiolas completamente con papel aluminio, llevar al ultrasonido por 10 minutos luego filtrar en viales y leer las muestras por HPLC por duplicado.

### CAPITULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se busca validar e implementar una metodología analítica para cuantificar el contenido de los ácidos  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico que se encuentran libres en los aceites vegetales por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), para ello se inició con la búsqueda y selección bibliográfica donde se halló metodologías para cuantificarlos por HPLC a longitudes de onda menores a 205 nm<sup>(62)</sup>, sin derivatización<sup>(23,66)</sup> y con una buena metodología analítica para validar dichos métodos a base de uso de estándares con pureza  $\geq 99\%$ <sup>(23,66)</sup>, por los resultados satisfactorios de estas metodologías analíticas, dicha metodología fue considerada para el desarrollo del presente trabajo<sup>(31)</sup>.

Para cuantificar la concentración de ácidos grasos omega libres en muestras de aceite vegetal se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC como se describe en el capítulo anterior.

Los resultados se muestran a continuación:

#### 1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

### 1.1. Linealidad

Este parámetro se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.

Para el desarrollo del presente parámetro fue necesario realizar 3 curvas de calibración para cada estándar de ácido omega 3, 6 y 9, para lo cual se prepararon 5 puntos de concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm y se procesaron por HPLC por duplicado. El proceso se repite 3 veces y se toman los datos medios de cada proceso.

En la tabla N° 08 se muestran las áreas correspondientes al ácido  $\alpha$ -linolénico y su correspondiente análisis estadístico, con cuyos datos promedio se procede a graficar una curva de calibración que se muestra en el gráfico N° 01 obteniéndose un valor para  $r^2$  de 0.9992.

En la tabla N° 09 se muestran las áreas correspondientes al ácido linoléico y su correspondiente análisis estadístico, con cuyos datos promedio se procede a graficar una curva de calibración que se muestra en el gráfico N° 02 obteniéndose un valor para  $r^2$  de 0.9982.

En la tabla N° 10 se muestran las áreas correspondientes al ácido oleico y su correspondiente análisis estadístico, con cuyos datos promedio se procede a graficar una curva de calibración que se muestra en el gráfico N° 03 obteniéndose un valor para  $r^2$  de 0.9974.

El valor  $r = 1$  indica una recta perfectamente lineal,  $r = -1$  una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y  $r = 0$  la no correlación entre X e Y. En la práctica, r es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros.

Como se observa en el gráfico N° 01, 02 y 03, el valor de r es de 0.9992, 0.9982 y 0.9974 para el ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico respectivamente, con cuyos resultados se afirma que hay proporcionalidad entre la concentración del

analito y su respuesta, o mejor dicho que la variación de la variable dependiente se relaciona en un 99,9 % con respecto a la variación de la variable independiente; del mismo modo se observa que los puntos están dentro de una línea recta entonces se puede afirmar que el método es lineal.

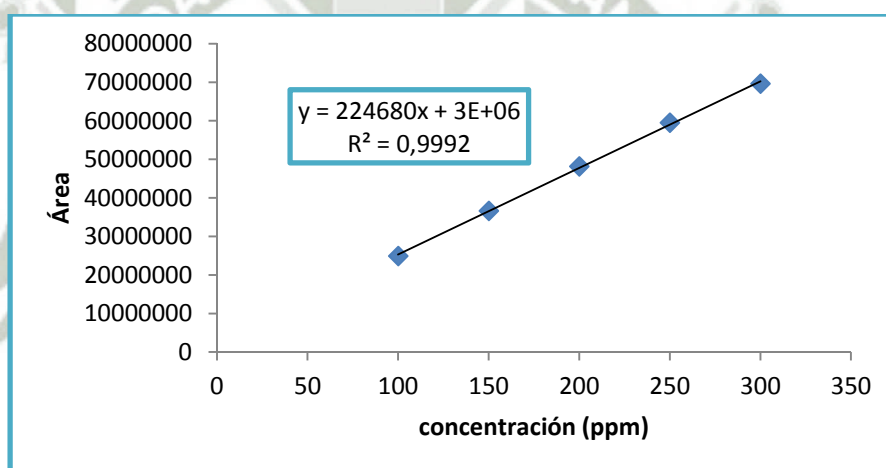


**Tabla N° 08.-** Lecturas promedio obtenidas para determinar la linealidad del ácido  $\alpha$ -linolénico.

concentración (ppm)	ÁREA I	ÁREA II	ÁREA III	PROMEDIO	s	DSR
100	25015147	24829400	24878586	24907711	96238	0.39
150	36611876	36253005	36946811	36603897	346972	0.95
200	48167800	48223994	48161233	48184342	34496	0.07
250	59752801	60440055	58319136	59503997	1082128	1.82
300	70468651	70861864	67552775	69627763	1807716	2.60

**Fuente:** *Elaboración propia*

Con los datos de la **Tabla N° 08** se obtiene la siguiente curva de calibración.



**Gráfico N° 01.-** Curva de calibración para la determinación de ácido  $\alpha$ -linolénico.

**Fuente:** *Elaboración Propia*

Del gráfico anterior se obtiene los valores a, b y  $r^2$  en donde:

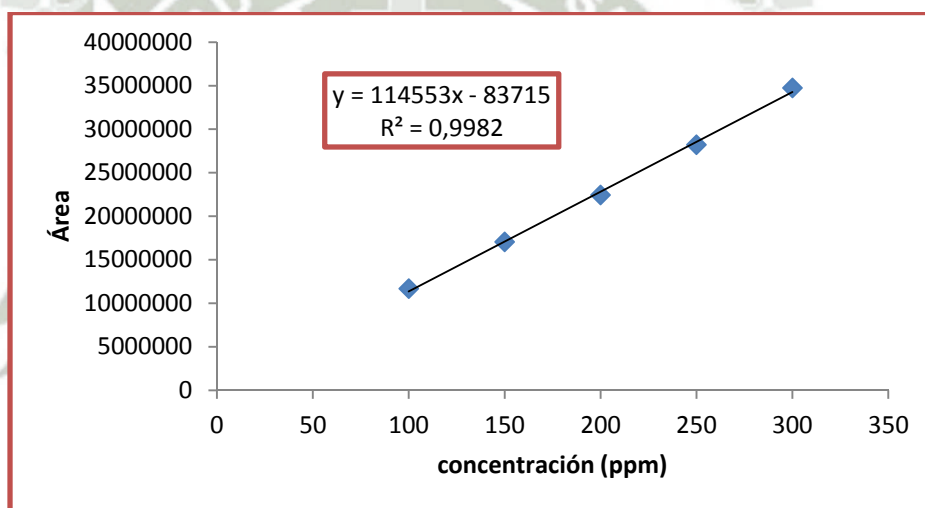
a	2829460.40
b	224680.41
$r^2$	0.9992

**Tabla N° 09.- Lecturas promedio obtenidas para determinar la linealidad del ácido linoléico.**

concentración (ppm)	ÁREA I	ÁREA II	ÁREA III	PROMEDIO	s	DSR
100	11801902	11411360	11845661	11686308	239115	2.05
150	17017638	16347547	17781378	17048854	717425	4.21
200	22862885	22289807	22176158	22442950	368087	1.64
250	28656120	28607368	27379182	28214223	723578	2.56
300	34360654	34980978	34883771	34741801	333642	0.96

**Fuente:** *Elaboración propia*

Con los datos de la **Tabla N° 09** se obtiene la siguiente curva de calibración.



**Gráfico N° 02.- Curva de calibración para la determinación de ácido linoléico.**

**Fuente:** *Elaboración Propia*

Del grafico anterior se obtiene los valores a, b y  $r^2$  en donde:

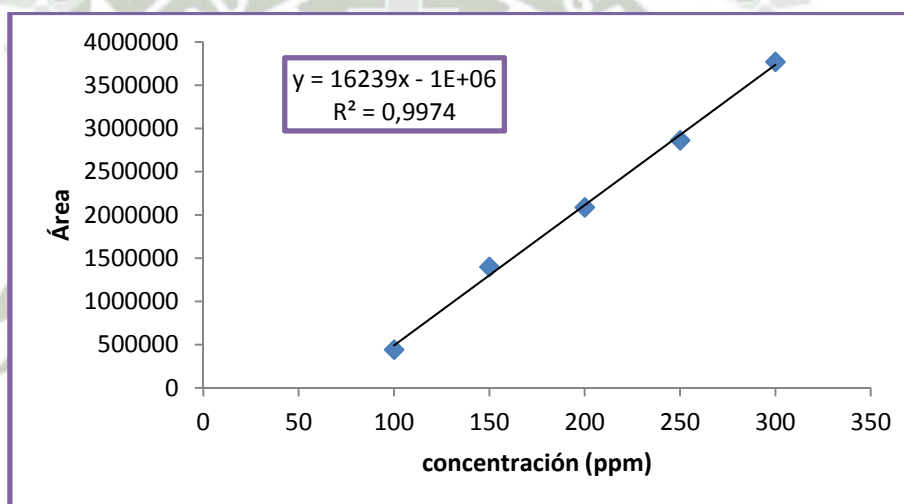
a	-83715.00
b	114552.71
r2	0.9982

**Tabla N° 10.-** Lecturas promedio obtenidas para determinar la linealidad del ácido oleico.

concentración (ppm)	ÁREA I	ÁREA II	ÁREA III	PROMEDIO	s	DSR
100	364348	522124	443251	443241	78888.00	17.80
150	1358465	1442913	1398544	1399974	42242.16	3.02
200	2051908	2138859	2075632	2088800	44946.19	2.15
250	2779454	3000170	2812565	2864063	119029.08	4.16
300	3613003	3947661	3752104	3770923	168120.79	4.46

**Fuente:** *Elaboración propia*

Con los datos de la **Tabla N° 10** se obtiene la siguiente curva de calibración.



**Gráfico N° 03.-** Curva de calibración para la determinación de ácido oleico.

**Fuente:** *Elaboración Propia*

Del gráfico anterior se obtiene los valores a, b y  $r^2$  en donde:

a	-1134380.87
b	16238.92
$r^2$	0.9974

## 1.2. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de **detección** y de **cuantificación**.

**Límite de detección** corresponde, según la, USP XXX, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.),

**Límite de cuantificación** corresponde, según la misma referencia, a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración.

Tomando las curvas de calibración obtenidas en la determinación de la linealidad, representada por sus respectivas ecuaciones de la recta para cada ácido omega calculadas entre 100 y 300 ppm inyectados, se efectúan tres mediciones por duplicado en la inferior de la curva para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Se puede observar que en la tabla N° 14 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo del límite de detección y de cuantificación, para el presente método analítico se obtuvo un límite de detección de 2.84, 2.39, 5.65 ppm, un límite de cuantificación de 7.76, 7.44 y 23.72 ppm para el ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico respectivamente.

**Determinación de la sensibilidad para ácido  $\alpha$ -linolénico.**

**Tabla N° 11.- Lecturas obtenidas para determinar la sensibilidad del ácido  $\alpha$ -linolénico.**

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área media (promedio)	s	RSD
25	4787846	4962015	4874931	123156.08	2.53
50	9575692	9704030	9639861	90748.67	0.94
75	14363537	14286045	14324791	54795.12	0.38

**Fuente:** elaboración propia.

a. Cálculo de la respuesta a concentración cero:

El análisis de regresión tomando los valores medios de área de la recta  $Y=188997X + 1633$ , la estimación de la respuesta a concentración cero es  $Y_{bl}=163334$

Concentración	Área media
25	4874931
50	9639861
75	14324791

$$y = 188997x + 1633$$

$$Y_{bl} = 163334$$

b. Calculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

Se efectúa el análisis de regresión tomando la concentración como X y desviación estándar como Y.

Concentración	s
25	123156.08
50	90748.67
75	54795.12

$$y = -1367.2x + 15792$$

$$S_{bl} = 157928$$

La recta calculada es:  $Y = -1367.2 X + 15792$  se toma como  $S_{bl} = 157928$

Luego, usando la ecuación de la curva de calibración para ácido  $\alpha$ -linolénico

$$y = 224680x + 2829460$$

Tomamos como pendiente b: 224680 los índices a calcular son:

Límite de cuantificación = 2.84 ppm

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Límite de cuantificación = 7.76 ppm

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

### Determinación de la sensibilidad para el ácido linoléico.

**Tabla N° 12.- Lecturas obtenidas para determinar la sensibilidad del ácido linoléico.**

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área media	s	RSD
25	2895076	2981415	2938246	61050.89	2.08
50	5890151	5953831	5921991	45028.56	0.76
75	8785227	8814246	8799737	20519.53	0.23

**Fuente:** elaboración propia.

a. Cálculo de la respuesta a concentración cero:

El análisis de regresión tomando los valores medios de área de la recta  $Y = 117230X + 25167$ , la estimación de la respuesta a concentración cero es  $Y_{bl} = 25167$

Concentración	Área media
25	2938246
50	5921991
75	8799737

$$y = 117230x + 25167$$

$$Y_{bl} = 25167$$

- b. Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

Se efectúa el análisis de regresión tomando la concentración como X y desviación estándar como Y.

Concentración	s
25	61050.89
50	45028.56
75	20519.53

$$y = -810.63x + 82731$$

$$S_{bl}=82731$$

La recta calculada es:  $Y = -810.63X + 82731$  se toma como  $S_{bl} = 82731$

Luego, usando la ecuación de la curva de calibración para ácido linoléico

$$y = 114553x - 83715$$

Tomamos como pendiente b: 114553 los índices a calcular son:

Límite de cuantificación = 2.39 ppm

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Límite de cuantificación = 7.44 ppm

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

### Determinación de la sensibilidad para el ácido oleico

Tabla N° 13.- *Lecturas obtenidas para determinar la sensibilidad del ácido oleico.*

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área media	s	RSD
25	887223	839497	863360	33747.38	3.91
50	1754446	1784970	1769708	21583.73	1.22
75	2651668	2673462	2662565	15410.69	0.58

Fuente: elaboración propia.

c. Cálculo de la respuesta a concentración cero:

El análisis de regresión tomando los valores medios de área de la recta  $Y=35984X - 33994$ , la estimación de la respuesta a concentración cero es  $Y_{bl} = -33994$

Concentración	Área media
25	863360
50	1769708
75	2662565

$$y = 35984x - 33994$$

$$Y_{bl} = -33994$$

d. Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

Se efectúa el análisis de regresión tomando la concentración como X y desviación estándar como Y.

Concentración	s
25	33747.38
50	21583.73
75	15410.69

$$y = -366.73x + 41917$$

$$S_{bl} = 41917$$

La recta calculada es:  $Y = -366.73 X + 41917$  se toma como  $S_{bl} = 41917$

Luego, usando la ecuación de la curva de calibración para ácido oleico

$$y = 16239x - 1134381$$

Tomamos como pendiente b: 16239 los índices a calcular son:

Límite de cuantificación = 5.65 ppm

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Límite de cuantificación = 23.72 ppm

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

**Tabla N° 14.- Límites de detección y cuantificación para los 3 ácidos omega**

	Ácido $\alpha$ - linolénico	Ácido Linoleico	Ácido Oleico
Y <sub>bl</sub>	163334	25167	-33994
S <sub>bl</sub>	157928	82731	41917
pendiente b	224680	114553	16239
<b>LD (ppm)</b>	<b>2.84</b>	<b>2.39</b>	<b>5.65</b>
<b>LC (ppm)</b>	<b>7.76</b>	<b>7.44</b>	<b>23.72</b>

**Fuente:** Elaboración propia

### 1.3. Precisión

Este parámetro está relacionado a la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar estimada analíticamente por  $s$  o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). La precisión debe medirse en condiciones REPETITIVAS (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones REPRODUCIBLES (diferente analista, diferente día, diferente instrumento).

El cociente repetibilidad/reproducibilidad es un parámetro muy útil para evaluar la precisión de un método analítico. Su valor, según la AOAC esta normalmente comprendido entre 1.5 y 2. Valores mayores de 2 pueden indicar un método “muy personal”, mientras un valor menor de 1.5 indica pobre repetibilidad de algún analista en una serie de mediciones.

Para el presente trabajo se realizó la precisión con una muestra que fue preparada 6 veces en las mismas condiciones para el ensayo de REPETITIBILIDAD, y 6 veces en diferentes condiciones para el ensayo de REPRODUCIBILIDAD del método.

El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados.

Así, la USP indica en general que una RSD del método debe ser menor de 2.7%. En la Tabla N° 17 se muestra una RSD en condiciones repetitivas de 1.28 y 1.34% para el ácido  $\alpha$ -linolénico y linoléico respectivamente, asimismo, una RSD en condiciones reproducibles de 0.77 y 0.72% para el ácido  $\alpha$ -linolénico y linoléico respectivamente. Según estudios realizados por la AOAC el cociente de repetibilidad/reproducibilidad esta normalmente comprendido entre 1.5 y

2, en la Tabla se muestra un cociente de 1.7 y 1.9 para el ensayo de precisión de ácido  $\alpha$ -linolénico y linoléico respectivamente.

También se muestran los intervalos de confianza de  $\pm 0.55$  y  $0.28$  para para el ácido  $\alpha$ -linolénico y linoléico respectivamente.

En la Tabla N° 17 no se muestran los resultados del ácido oleico debido a que en la muestra está presente el ácido oleico en muy bajas concentraciones y el método no puede ser capaz de cuantificarlo como lo indica el punto 1.2.3 que describe que el límite de cuantificación es de 23.72 ppm para el ácido oleico.

Los resultados obtenidos en para cada acido omega fueron incluso altos en comparación con los resultados obtenidos por V. Guarrasi y colaboradores <sup>(21)</sup> que obtuvo como límite de cuantificación 6.8, 0.4 ,0.05 ppm para los ácidos oleico, linoléico y  $\alpha$ -linolénico respectivamente, esto debido a que trabajan una longitud de onda superior que es de 208 nm.

Tomando en cuenta que se los valores hallados se encuentran dentro de las especificaciones dadas por la USP y AOAC podemos afirmar que nuestro método es preciso.

**Tabla N° 15.- Datos y cálculos para la determinación de la desviación estándar relativa (RSD) para el parámetro de precisión.**

ENSAYO DE PRECISION (Repetitibilidad)											
NUMERO	Volumen (ml)	AREA						CONCENTRACIONES			
		Ácido α-linolénico	Ácido linoléico	Ácido oleico	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linoléico ppm	Ácido oleico ppm	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linoléico ppm	Ácido oleico ppm	
1	0.2048	12291533	2217764	0	42.11	20.09	0	0	0	0	
2	0.2035	12014761	2246591	0	40.88	20.34	0	0	0	0	
3	0.2059	11983272	2194480	0	40.74	19.89	0	0	0	0	
4	0.2052	12018642	2163034	0	40.90	19.61	0	0	0	0	
5	0.1988	12074843	2212842	0	41.15	20.05	0	0	0	0	
6	0.1988	11982925	2240241	0	40.74	20.29	0	0	0	0	
PROMEDIO (X)		12060996	2212492	0	41.09	20.04	0	0	0	0.00	
DESVIACION ESTANDAR (s)					0.524	0.269				0.000	
DESVIACION ESTANDAR RELATIVA (RSD)					1.276	1.340				-	

**Fuente:** Elaboración propia

Límites de confianza

GRADOS DE LIBERTAD	5
t- Tabla	2.571
n	6

Ácido α-Linolénico	(+ / -)
Intervalo de confianza del 95% de la media	0.55

Ácido Linoléico	(+ / -)
Intervalo de confianza del 95% de la media	0.28

**Tabla N° 16.- Datos y cálculos para la determinación de la desviación estándar relativa (RSD) para el parámetro de precisión.**

ENSAYO DE PRECISIÓN										
NUMERO	Volumen ml	ÁREA			CONCENTRACIONES					
		Ácido α- linoléico	Ácido linoléico	Ácido oleico	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linoléico ppm	Ácido oleico ppm	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linoléico ppm	Ácido oleico ppm
1	0.2	12450979	2201076	0	42.82	19.95	0			
2	0.2	12514547	2246435	0	43.11	20.34	0			
3	0.2	12513032	2202474	0	43.10	19.96	0			
4	0.2	12483030	2217767	0	42.97	20.09	0			
5	0.2	12504734	2209430	0	43.06	20.02	0			
6	0.2	12321533	2217764	0	42.25	20.09	0			
PROMEDIO (X)		12464642.5	2215824.333	0	42.88	20.07	0.00			
DESVIACION ESTANDAR (s)					0.330	0.145	0.000			
DESVIACION ESTANDAR RELATIVA (RSD)					0.769	0.723	-			

Fuente: *Elaboración propia*

**Límites de confianza**

GRADOS DE LIBERTAD	5
t- Tabla	2.571
n	6

Ácido α-Linolénico	(+ / -)
Intervalo de confianza del 95% de la media	0.35

Ácido Linoléico	(+ / -)
Intervalo de confianza del 95% de la media	0.15

**Tabla N° 17.- Resultados del ensayo de precisión**

		Ácido $\alpha$ -linolénico	Ácido linoléico
Repetitibilidad	RSD (%)	1.28	1.34
	intervalo de confianza (+/-)	0.55	0.28
Reproducibilidad	RSD (%)	0.77	0.72
	intervalo de confianza (+/-)	0.35	0.15
Parámetro repetitibilidad/reproducibilidad		1.7	1.9

**Fuente:** Elaboración propia

#### 1.4. Exactitud

Este parámetro se refiere al valor medido que se obtiene, el cual debe ser muy próximo al de referencia. En otras palabras el porcentaje de recuperación del analito debe acercarse al 100%.

En el presente trabajo se agregó una cantidad de estándar conocida de cada ácido omega a las muestras leídas en el ensayo de precisión. Pero se tomó un tratamiento especial al ensayo con el ácido oleico ya que se agregó 20 ppm a una muestra para confirmar la presencia de ácido oleico libre lo cual dio positivo así que de inmediato se dio el mismo tratamiento a todas las muestras agregando así después 150 ppm del estándar de ácido oleico, 105 ppm de ácido  $\alpha$ -linolénico y 150 ppm de ácido linoléico. Y se procedió a leer las muestras. Y los resultados se muestran a continuación.

Como se observa en la tabla N° 18 y 19, se obtuvieron valores de desviación estándar relativa (DSR) de 1.33 y 2.01%, el porcentaje de recuperación fue de 100.6 y 100.5% dentro de los límites establecidos.

Para el ácido oleico se obtuvieron una RSD promedio de 110.6% esto debido a que la muestra efectivamente tiene unas cantidades incuantificables de ácido oleico, ver tabla N° 20.

**Tabla N° 18.-** Cálculo del porcentaje de recuperación para el ácido  $\alpha$ -linolénico

ppm agregado	Concentración sin fortificar	Concentración fortificada	ppm F- ppm SF	% RECUPERACION
105	42.11	147.81	105.70	100.7
105	40.88	147.82	106.94	101.8
105	40.74	147.74	107.00	101.9
105	40.90	146.15	105.25	100.2
105	41.15	144.33	103.18	98.3
105	40.74	146.45	105.71	100.7
promedio				100.6
Desviación Estándar				1.33
RSD				1.32

**Fuente:** *Elaboración propia*

**Tabla N° 19.-** Cálculo del porcentaje de recuperación para el ácido linoléico

ppm agregado	Concentración sin fortificar	Concentración fortificada	ppm F-ppm SF	% RECUPERACION
150	20.09	173.03	152.94	102.0
150	20.34	175.44	155.10	103.4
150	19.89	171.62	151.73	101.2
150	19.61	167.72	148.11	98.7
150	20.05	167.21	147.16	98.1
150	20.29	170.00	149.71	99.8
promedio				100.5
Desviación estándar				2.01
RSD				2.00

**Fuente:** *Elaboración propia*

**Tabla N° 20.-** Cálculo del porcentaje de recuperación para el ácido oleico

ppm agregado	Concentración sin fortificar	Concentración fortificada	ppm F-ppm SF	% RECUPERACION
170	0.00	191.25	191.25	112.5
170	0.00	181.91	181.91	107.0
170	0.00	205.15	205.15	120.7
170	0.00	182.10	182.10	107.1
170	0.00	190.02	190.02	111.8
170	0.00	177.83	177.83	104.6
promedio				110.6
Desviación estándar				5.8
RSD				5.2

Fuente: *Elaboración propia.*

### 1.5. Selectividad

#### Estándar

Podemos observar que el pico correspondiente al ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico con tiempos de retención de 3.2, 4.3 y 6.3 min respectivamente.

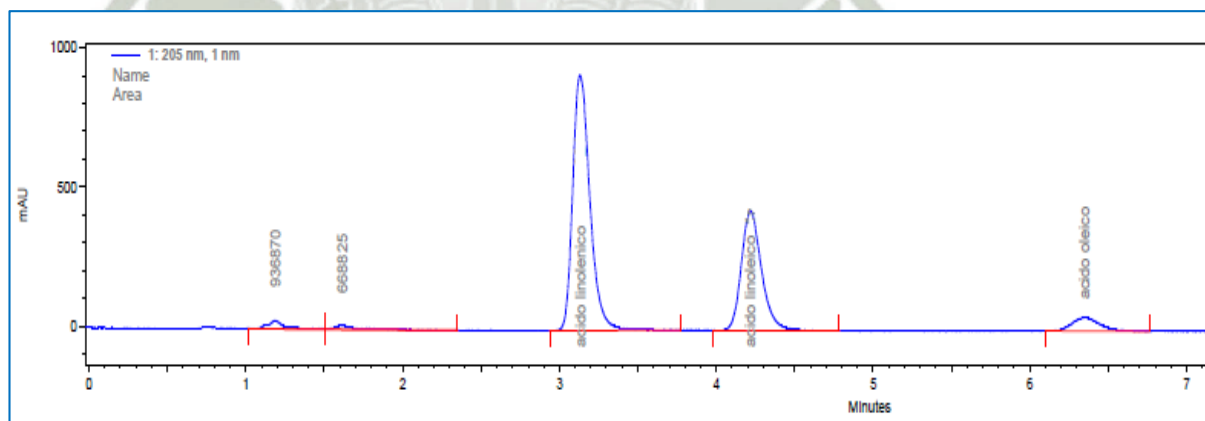
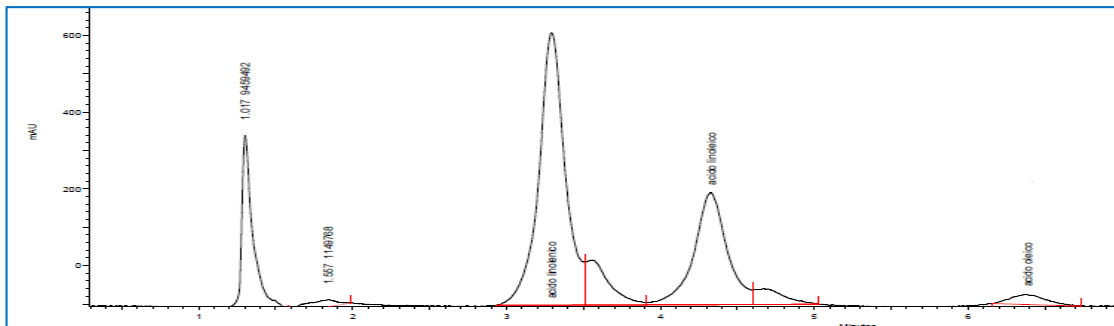


Figura N° 07

Solución sometida a Hidrólisis Acida

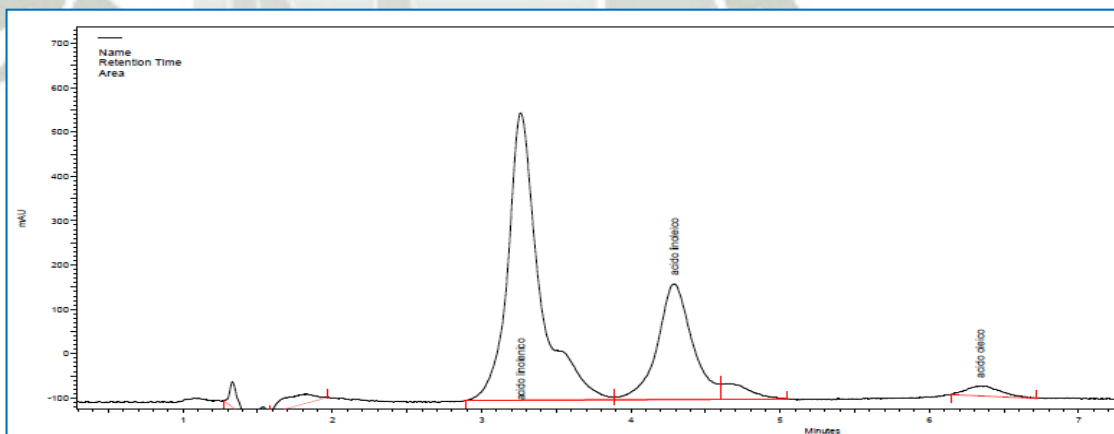
Podemos observar que el pico correspondiente al ácido  $\alpha$ -linolénico y linoleico sufrió degradación pero no se detecta ninguna respuesta significativa en el tiempo de retención, es decir no existe INTERFERENCIA .



**Figura N° 08**

Solución sometida a Hidrólisis Alcalina

Podemos observar que el pico correspondiente al ácido  $\alpha$ -linolénico y linoleico sufrió degradación pero no se detecta ninguna respuesta significativa en el tiempo de retención, es decir no existe INTERFERENCIA.



**Figura N° 09**

Solución sometida a Fotólisis

Podemos observar que el pico correspondiente al ácido  $\alpha$ -linolénico y linoleico sufrió degradación pero no se detecta ninguna respuesta significativa en el tiempo de retención, es decir no existe INTERFERENCIA.

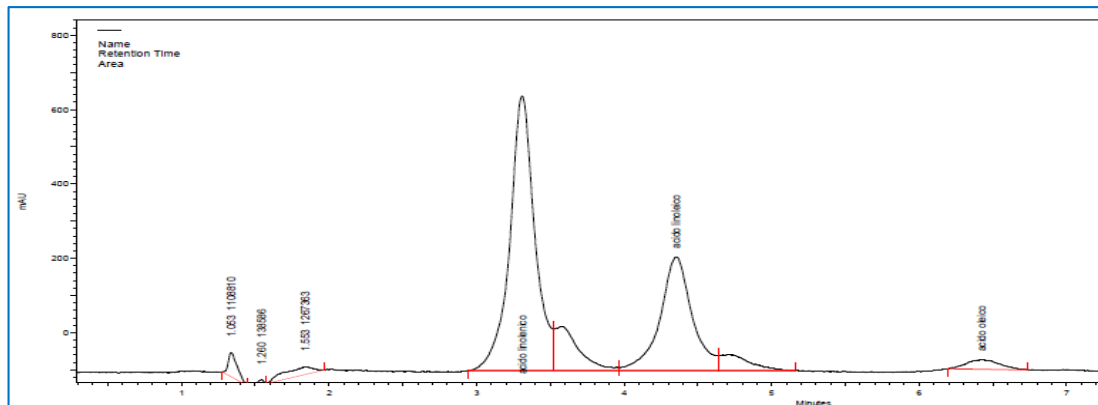


Figura N° 10

### Solución sometida a Oxidación

Se observó que la degradación es notoria; pero esta no interfiere con el tiempo de retención, es decir no existe INTERFERENCIA.

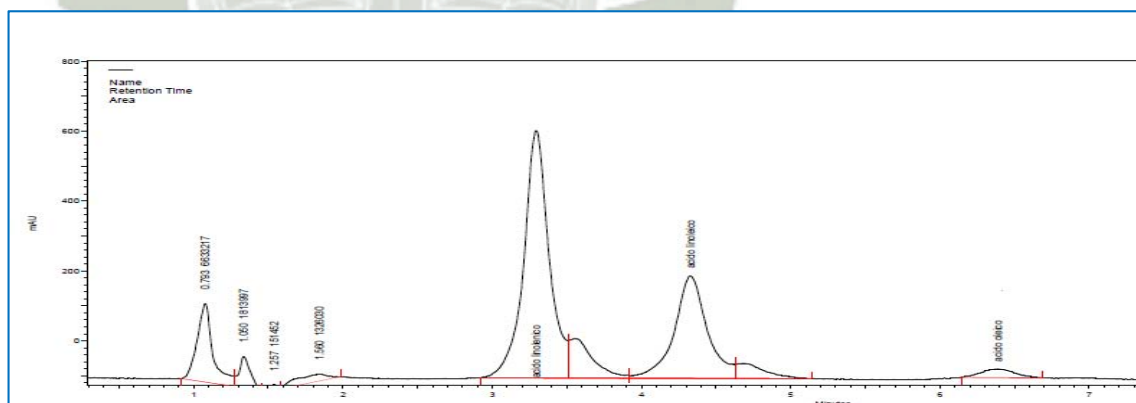
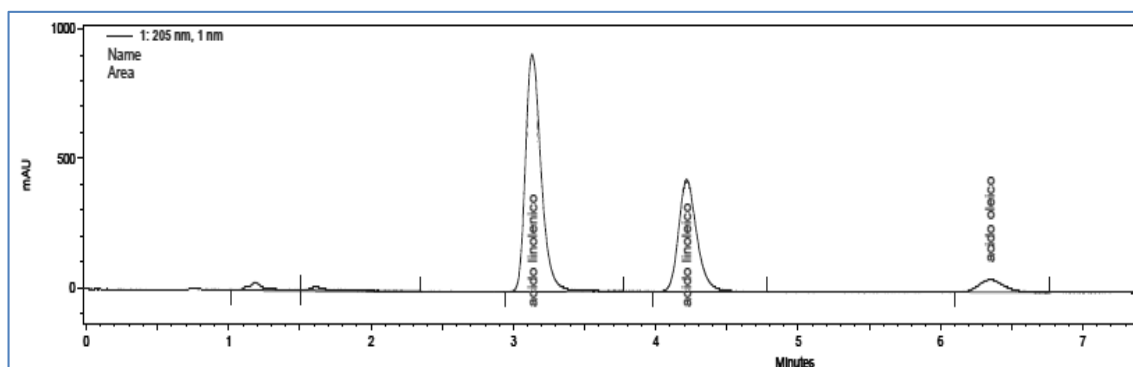


Figura N° 11

### Solución sometida a Hidrólisis

No se detecta ninguna respuesta significativa en el cromatograma, es decir no existe INTERFERENCIA.



**Figura N° 12**

En los cromatogramas de las figuras N° 08, 09, 10 y 11 presentan ensanchamiento o un lomo en cada pico lo que se debe a que la columna esta en sobre uso.

## **2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA EN ACEITES VEGETALES**

Se determinaron por HPLC la cantidad de ácidos omega libres en diferentes aceites de origen vegetal. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N° 26 con concentraciones aproximadas a las especificadas en los envases debido a que en el presente las muestras no fueron saponificadas.

Se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 5 muestras de aceites vegetales de linaza, sacha Inchi, soja y zapallo de variedades Zambo y Macre, determinando el contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico libre de 25.7, 20.3, 6.0, 2.6 y 2.3% respectivamente y ácido linoléico libre de 10.4, 9.9, 24.5, 10.1 y 11.7%. No se detectó ácido oleico debido a que las muestras contienen muy baja concentración del mismo.

Tabla N° 21.- Resultados en g/L de ácidos omega libres en aceite de linaza

ACEITE DE LINAZA											
N°	Volumen (ml)	ÁREA (Mau)				CONCENTRACIONES				Concentración ( g/L)	
		Ácido α-linolénico	Ácido linolénico	Ácido oleico	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linolénico ppm	Ácido oleico ppm	Ácido α-linolénico	Ácido linolénico		
1	0.2	14534747	2313889	0	52.10	20.93	0	2.60	1.05		
2	0.2	14229654	2296535	0	50.74	20.78	0	2.54	1.04		
PROMEDIO (X)		14382200.5	2305212	0	51.42	20.85	0.00	2.57	1.04		
DESVIACION ESTANDAR (s)								0.048	0.005		

Fuente: *Elaboración propia*

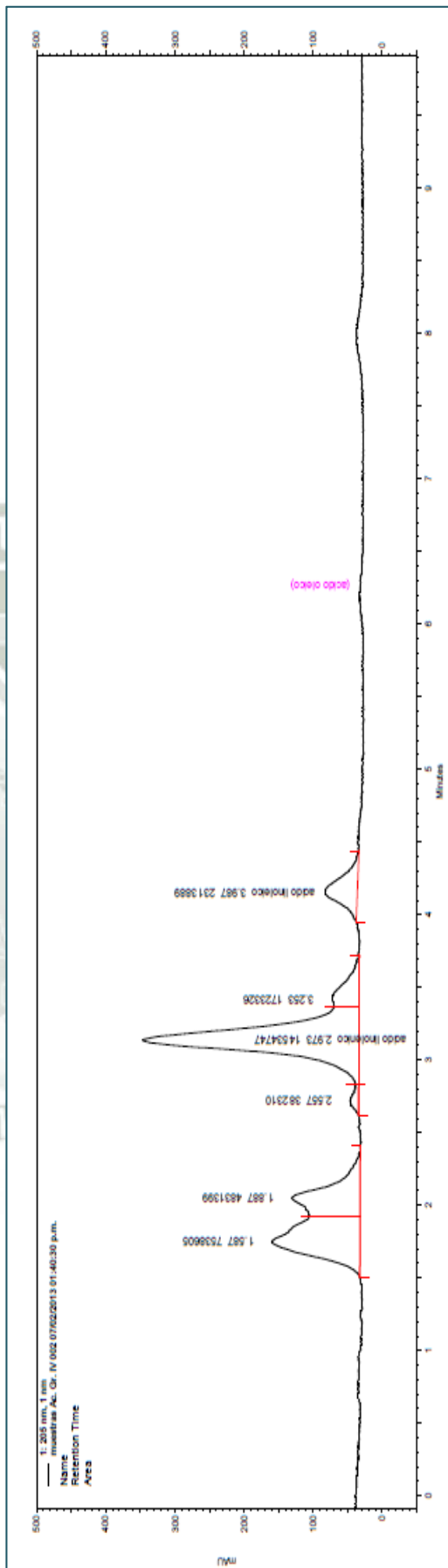


Figura N° 13.- Cromatograma de ácido α-linolénico y linolénico en Linaza.

Tabla N° 22.- Resultados en g/L de ácidos omega libres en aceite de Soja

ACEITE DE SOJA										
N°	Volumen (ml)	ÁREA (mAU)				CONCENTRACIONES				CONCENTRACIONES (g/L)
		Ácido α-linolénico	Ácido linolénico	Ácido oleico	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linolénico ppm	Ácido oleico ppm	Ácido α-linolénico	Ácido linolénico	Ácido linolénico
1	0.2	5540250	5605021	0	12.07	49.66	0	0.59	2.43	
2	0.2	5632541	5698562	0	12.48	50.48	0	0.61	2.48	
PROMEDIO (X)		5586395.5	5651791.5	0	12.27	50.07	0.00	<b>0.60</b>	<b>2.45</b>	
DESVIACION ESTANDAR (s)					0.290	0.577	0.000	0.017	0.039	

Fuente: *Elaboración propia*

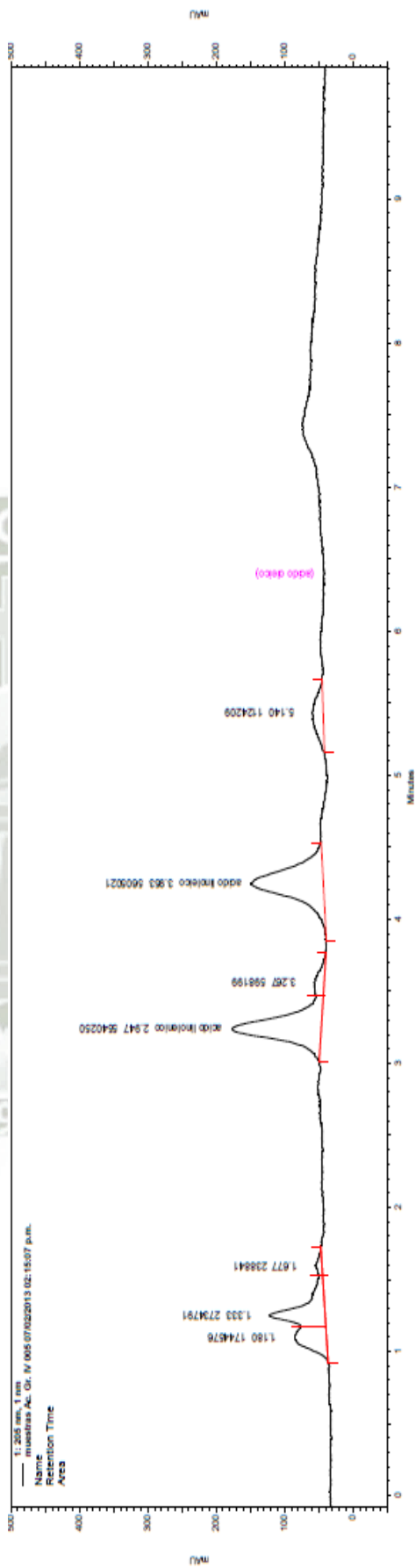


Figura N° 14.- Cromatograma de ácidoα-linolénico y linoleico en Soja.

Tabla N° 23.- Resultados en g/L de ácidos omega libres en aceite de sachá Inchi

ACEITE DE SACHA INCHI											
NUMERO	Volumen (ml)	ÁREA (mAU)				CONCENTRACIONES				CONCENTRACIONES (g/L)	
		Ácido α-linolénico	Ácido linoléico	Ácido α-linolénico ppm	Ácido oleico	Ácido linoléico ppm	Ácido α-linolénico ppm	Ácido oleico ppm	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linoléico ppm	
1	0.2	12291533	2217764	42.11	0	20.09	0	20.09	2.06	0.98	
2	0.2	12014761	2246591	40.88	0	20.34	0	20.34	2.01	1.00	
3	0.2	11983272	2194480	40.74	0	19.89	0	19.89	1.98	0.97	
4	0.2	12018642	2163034	40.90	0	19.61	0	19.61	1.99	0.96	
5	0.2	12074843	2212842	41.15	0	20.05	0	20.05	2.07	1.01	
6	0.2	11982925	2240241	40.74	0	20.29	0	20.29	2.05	1.02	
PROMEDIO (X)		12060996	2212492	41.09	0	20.04	0	20.04	<b>2.03</b>	<b>0.99</b>	
DESVIACION ESTANDAR (s)				0.524		0.269		0.269	0.037	0.025	

Fuente: *Elaboración propia*

**Tabla N° 24.- Resultados en g/L de ácidos omega libres en aceite de Zapallo (Sambo).**

ACEITE DE ZAPALLO (sambo)											
		ÁREA (mAU)				CONCENTRACIONES				CONCENTRACIONES (g/L)	
NUMERO	Volumen (ml)	Ácido α-linolénico	Ácido linoléico	Ácido oleico	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linoléico ppm	Ácido oleico ppm	Ácido α-linolénico	Ácido linoléico	Ácido oleico	Ácido linoléico
1	0.5	5975154	5420149	0	14.00	48.05	0	0.28	0.96		0.96
2	0.5	6004162	5420149	0	14.13	48.05	0	0.28	0.96		0.96
PROMEDIO (X)		5989658	5420149	0	14.07	48.05	0.00	0.28	0.96		0.96
DESVIACION ESTANDAR (s)					0.091	0.000	0.000	0.002	0.000		0.000

Fuente: *Elaboración propia*

**Tabla N° 25.- Resultados en g/L de ácidos omega libres en aceite de Zapallo (Macre).**

ACEITE DE ZAPALLO (macre)											
		ÁREA (mAU)				CONCENTRACIONES				CONCENTRACIONES (g/L)	
NUMERO	Volumen (ml)	Ácido α-linolénico	Ácido linoléico	Ácido oleico	Ácido α-linolénico ppm	Ácido linoléico ppm	Ácido oleico ppm	Ácido α-linolénico	Ácido linoléico	Ácido oleico	Ácido linoléico
1	0.5	5178677	6581205	0	10.46	58.18	0	0.21	1.16		1.16
2	0.5	5428165	6620120	0	11.57	58.52	0	0.23	1.17		1.17
PROMEDIO (X)		5303421	6600662.5	0	11.01	58.35	0.00	0.22	1.17		1.17
DESVIACION ESTANDAR (s)					0.785	0.240	0.000	0.016	0.005		0.005

Fuente: *Elaboración propia*

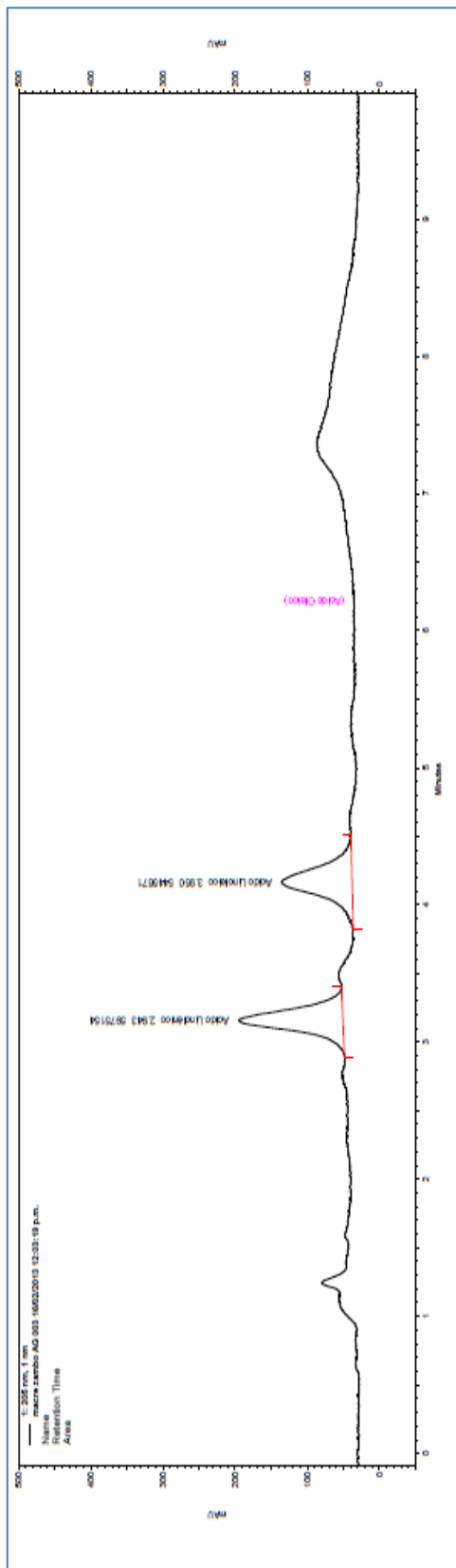


Figura N° 16.- Cromatograma de ácido-linolénico y linoleico en Zapallo Sambo.

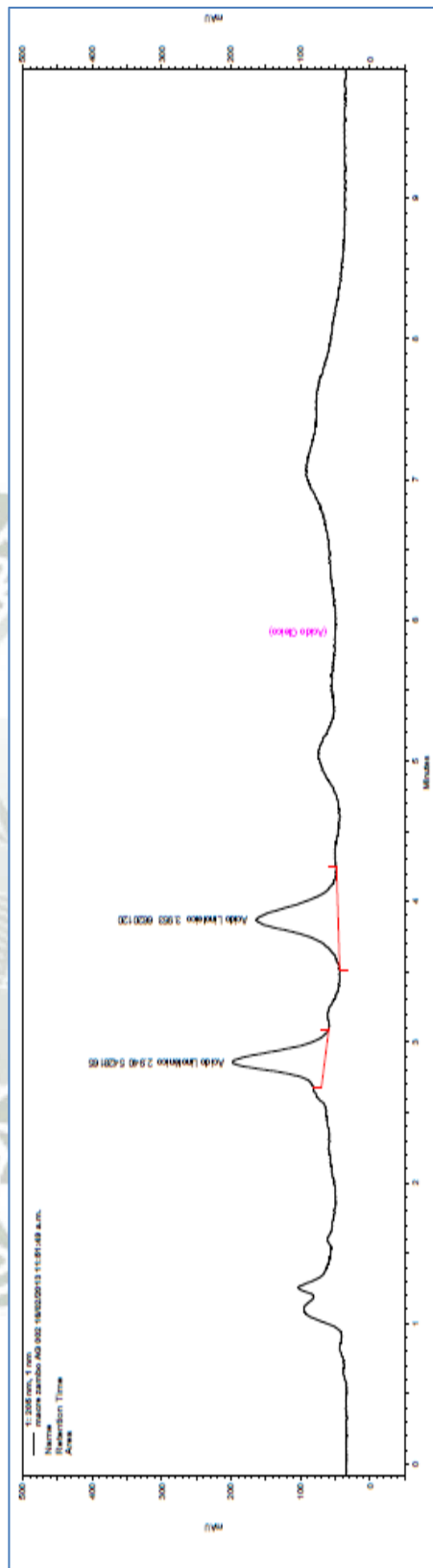


Figura N° 17.- Cromatograma de ácido- $\alpha$ -linolénico y linoleico en Zapallo Macre.

Tabla N° 26.- Resultados en g/L y g por cada 100 ml de muestra, de todos los aceites.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (g/L)			CONCENTRACIÓN % (g por cada 100 ml)	
	Ácido $\alpha$ -linolénico	Ácido linoléico	Ácido $\alpha$ -linolénico	Ácido $\alpha$ -linolénico	Ácido linoléico
LINAZA	2.57	1.04	25.7	10.4	
SOJA	0.60	2.45	6.0	24.5	
SACHA INCHI	2.03	0.99	20.3	9.9	
ZAPALLO SAMBO	0.29	0.96	2.9	9.6	
ZAPALLO MACRE	0.22	1.17	2.2	11.7	

Fuente: Elaboración propia

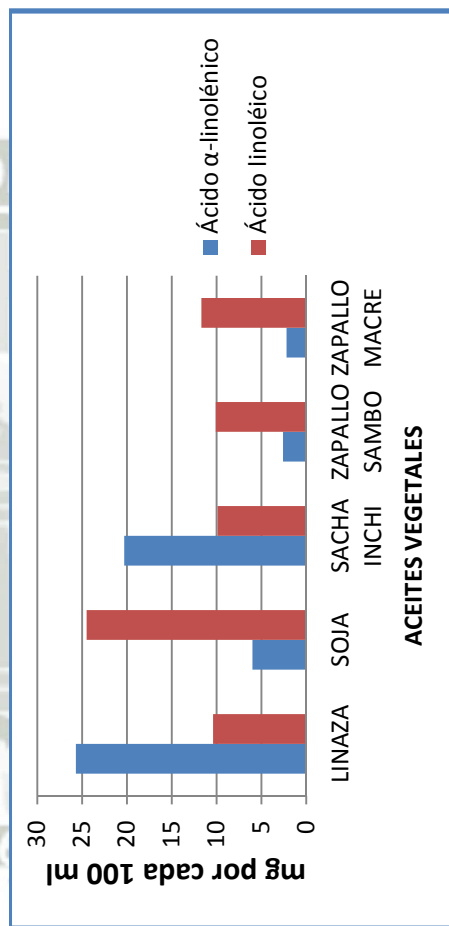


Figura N° 18. Histograma de la concentración encontrada en cada muestra de aceite vegetal

## CONCLUSIONES

1. Es posible usar Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinar y cuantificar ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico libres en aceites vegetales a 205 nm.
2. Para el desarrollo del método se utilizó una columna Rp 18 de 25 cm y una fase móvil de 85 % de acetonitrilo, 5% de metanol y acidificada con 10 % de ácido acético al 1%, obteniendo tiempos de retención de 3.2, 4.3 y 6.3 minutos para el ácido  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico respectivamente
3. El método analítico desarrollado es lineal (con  $r^2$  mayor a 0.995), preciso (coeficiente de variación CV menor a 2.7%), exacto (porcentaje de recuperación aproximado a 100 %) y selectivo para los ácidos  $\alpha$ -linolénico, linoléico y oleico.
4. Se cuantificaron ácido  $\alpha$ -linolénico y ácido linoléico para Linaza 25.7 y 10.4 %, Soja 6.0 y 24.5%, Sacha Inchi 20.3 y 9.9%, Zapallo Sambo 2.9 y 9.6%, Zapallo Macre 2.2 y 11.7% respectivamente.
5. En los aceites ya mencionados no se encontró ácido oleico libre.

## SUGERENCIAS

Se recomienda esta metodología analítica para la determinación de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados en muestras de la misma matriz.



## BIBLIOGRAFÍA

1. ACRORTH I; PLANTE M; BAILEY B; CRAFTS C. Quantitation of Underivatized Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Foods by HPLC and Charged Aerosol Detection; Thermo Fisher Scientific, Chelmsford, MA, USA.
2. AHUJA S; DONG MW. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC, volume 6; 2005.
3. BANNI S; CARTA G; CONTINI MS; ANGIONI E; DEIANA M; DESSI MA; CORONGIU FP. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues; J. Nutr. Biochem. 7:150-155, 1996.
4. BERNERT J; AKINS J; MILLER D. Direct Determination of the Linoleate/Oleate Ratio in Serum Cholesterol Esters by Liquid Chromatography, clin. chem. 28/4, 676-680 (1982)
5. BERRIDGE J. Techniques for the automated optimization of HPLC separations; 1985.
6. BISANG R; CAMPI M; CESA V. Biotecnología y desarrollo. 33, 2009.
7. BRONDZ I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques; 465 (2002) 1–37.
8. CANDELARIA S. Omega 3, 6, 9 what does it all add up to; 2009.

9. CAO Y; SUO Y. Extraction of Microula sikkimensis seed oil and simultaneous analysis of saturated and unsaturated fatty acids by fluorescence detection with reversed-phase HPLC; 23 (2010) 100–106.
10. CARUGHI A. The Role of Omega-3 Long-Chain Fatty Acids During Pregnancy.
11. CHAVARRIA S. Grasas y aceites comestibles; Primera Edición; 2010. URL disponible en:  
<http://www.minec.gob.sv/cajadeherramientasue/images/stories/fichas/honduras/hn-grasas-y-aceites-comestibles.pdf>
12. CHIRINOS O; ADACHI L; CALDERÓN L; DÍAZ R; LARREA L; MUCHA G; ROQUE L. Explotación de Sacha Inchi a los Estados Unidos, 2009. URL disponible en:  
[http://www.esan.edu.pe/publicaciones/Descargue\\_el\\_documento\\_completo.pdf](http://www.esan.edu.pe/publicaciones/Descargue_el_documento_completo.pdf)
13. CHOW CC; LAM H; ZHANG XM. Analytical Method validation and instrument performance verification RS189.A568 2004.
14. CRISCAUT P. Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud, ISBN987-23125-0-8, 2006.
15. DANIELS S. Omega-3 supplementation of children with learning and behavioural problems led to significant improvements, adding important data to this high profile subject; 2007.
16. DONALD VOET, JUDITH G.V. Bioquímica. Panamericana, 3ra edición, 2006; 397-400. URL disponible en:  
[http://books.google.com.pe/books?id=r5bedH\\_aST0C&pg=PA398&dq=acid+os+grasos+poliinsaturados&hl=es&sa=X&ei=h6T\\_UZO-](http://books.google.com.pe/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA398&dq=acid+os+grasos+poliinsaturados&hl=es&sa=X&ei=h6T_UZO-)

- [OI6C9QTb44HgDg&ved=0CE4Q6AEwBg#v=onepage&q=acidos%20grasos%20poliinsaturados&f=false](http://books.google.com/books?id=64x-gRS5520C&pg=PA306&dq=acidos+grasos+omega&hl=es&sa=X&ei=6qn_UaLwMoyC9QTD4IDACA&ved=0CF8Q6AEwCO#v=onepage&q=acidos%20grasos%20omega&f=false)
17. DONG MW. Modern HPLC for practicing scientists; 2006.
18. ENGELHARDT H. Practice of high performance liquid chromatography, Berlin; 1986.
19. FIGUEROLA F; MUÑOZ O; ESTÉVEZ AM. La Linaza como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de alimentos, agro sur 36 (2) 49-58 2008.
20. FREEMAN MP; HIBBELN JR; WISNER KL; BRUMBACH BH; WATCHMAN M; GALENBERG AJ. Randomized dose-ranging pilot trial of omega-3 fatty acids for postpartum depression; 2006.
21. GARMENDIA F; PANDO R; RONCEROS G. Efecto del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L) sobre el perfil lipídico en pacientes con hipolipoproteinemia, Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011; 28(4):628-32.
22. GIL HERNANDEZ A. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición, 2da edición, panamericana, Madrid, 2010, tomo I; 305-3012. URL disponible en: [http://books.google.com/books?id=64x-gRS5520C&pg=PA306&dq=acidos+grasos+omega&hl=es&sa=X&ei=6qn\\_UaLwMoyC9QTD4IDACA&ved=0CF8Q6AEwCO#v=onepage&q=acidos%20grasos%20omega&f=false](http://books.google.com/books?id=64x-gRS5520C&pg=PA306&dq=acidos+grasos+omega&hl=es&sa=X&ei=6qn_UaLwMoyC9QTD4IDACA&ved=0CF8Q6AEwCO#v=onepage&q=acidos%20grasos%20omega&f=false)
23. GUARRASI V; MAGIONE MR; SANFRATELLO V; MARTORANA V; BULONE D. Quantification of underivatized fatty acids from vegetable oils by HPLC with UV detection, 663, 2009. URL disponible en: <http://chromsci.oxfordjournals.org/content/48/8/663.full.pdf>
24. GULZAR S; ZUBER M. Determination of Omega-3 Fatty Acid Composition in Fresh Water Fish; Int. J. Agri. Biol., Vol. 2, No. 4, 2000.

25. GURKIN M; RIPPFAHN J. American laboratory; may, 99,1980.
26. HANAI T. HPLC a practical guide; ISBN 0-85404-515-5; 1999.
27. HARRIS DC; Analisis quimico cuantitativo, Grupo Editoria Iberoamerica; tercera edición; Agosto; 1990.
28. HERRERA M; VEGA Y LEON S; GUTIÉRREZ T; GARCÍA F; DÍAZ G; Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica, y salud; REB 25(3): 72-79, 2006.
29. HIBBERD ANGUS; SHARP G. Analisis of omega-3 fatty acids using a highly selective GC capillary column; 2007.
30. JEREMY M.B., JOHN L.T., LUBERT S. Bioquímica, 6ta edición, Reverté, Barcelona-España, 2008; Tomo I, 326-329. URL disponible en: [http://books.google.com.pe/books?id=HRr4MNH2YssC&printsec=frontcover&dq=bioquimica+jeremy+mark+berg&hl=es&sa=X&ei=vwEJUtk3Ac\\_q2wWM3IHQDg&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=bioquimica%20jeremy%20mark%20berg&f=false](http://books.google.com.pe/books?id=HRr4MNH2YssC&printsec=frontcover&dq=bioquimica+jeremy+mark+berg&hl=es&sa=X&ei=vwEJUtk3Ac_q2wWM3IHQDg&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=bioquimica%20jeremy%20mark%20berg&f=false)
31. JOFRE V. Validación de la metodología analítica para la determinación de ácidos grasos en aceites de oliva extra virgen; chile, 2009. URL disponible en: [http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-jofre\\_v/pdfAmont/qf-jofre\\_v.pdf](http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-jofre_v/pdfAmont/qf-jofre_v.pdf)
32. KAZAKEVICH Y; LOBRUTTO R. HPLC for pharmaceutical scientist; 2007.
33. KIDD PM. Omega-3 DHA and EPA for Cognition, Behavior, and Mood: Clinical Findings and StructuralFunctional Synergies with Cell Membrane Phospholipids; 2007.
34. KIVINI H; JARVENPAA; ARO H; HUOPALAHTI R; RIHANEN L. Qualitative and Quantitative Liquid Chromatographic Analysis Methods for

- the Determination of the Effects of Feed Supplements on Hen Egg Yolk Phospholipids; 2004.
35. LAFONT J; PÁES M; PORTACION A. Extracción y Caracterización Físicoquímica del Aceite de la Semilla (Almendra) del Marañón (*Anacardium occidentale L*), Vol. 22(1), 51-58 (2011).
36. LAWRENCE JF; FREI RW; Chemical derivatization in liquid chromatography, Elsevier, New York; 1976.
37. LI G; JINMAO Y; SUO Y; SONG C; SUN Z; XIA L; ZHAO X; SHI J. A developed pre-column derivatization method for the determination of free fatty acids in edible oils by reversed-phase HPLC with fluorescence detection and its application to Lycium barbarum seed oil; 125 (2011) 1365–1372.
38. LI Z; GU T; KELDER B; KOPCHICK JJ. Analysis of Fatty Acids in Mouse Cells Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography; 2001.
39. LIANG LI G; CHEN G; QIU LIU Y; HUA JING N; MAO YOU J. A sensitive and selective HPLC-FLD method with fluorescent labeling for simultaneous detection of bile acid and free fatty acid in human serum; B, 895– 896 (2012) 191– 195.
40. LIN PY; PIN SU K. A Meta-Analytic Review of Double-Blind, Placebo-Controlled Trials of Antidepressant Efficacy of Omega-3 Fatty Acids; 2007.
41. LINETTE L. Guía para el manejo integrado y cultivo del zapallo, 2013.
42. Liquid Chromatography Terms and Relationships. ASTM; 1979.
43. LOGAN AC. Neurobehavioral Aspects of Omega-3 Fatty Acids: Possible Mechanisms and Therapeutic Value in Major Depression; volumen 8; 2003.

44. MANSOUR MP; FRAMPTON DMF; NICHOLS PD; ROBERT S; GURNEY R; BLACKBURN S; PETRIE J; LIU Q; SINGH S. Omega-3 oils, analytical methods for characterisation and purification; 2001.
45. MARAGELL LB; MARTINEZ JM; ZBOYAN HA; KERTZ B; FLORENCE H; PURYEAR L. A Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in the Treatment of Major Depression; Am J Psychiatry 160:5, May 2003.
46. MC POLIN O; Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis; 2009.
47. MCMMASTER MC. HPLC a practical user's guide, second edition; 2007.
48. MEHMETOGLU I; HUMEYRA YF; KURBAN S; POLAT H. Plasma  $\omega$ -3 fatty acid levels negatively and  $\omega$ -6 fatty acid levels positively associated with other cardiovascular risk factors including homocysteine in severe obese subjects Nutr 2012;21 (4):519-525.
49. MILLER JC; MILLER JN. Statistics for analytical chemistry, ellis horwood ltd. John Wiley & Sons; chichester; 1984.
50. MORRIS D. Metabolismo del alfa linolénico.
51. NEVES L; PEREIRA MA; MOTA M; ALVES MM. Detection and quantification of long chain fatty acids in liquid and solid samples and its relevance to understand anaerobic digestion of lipids 100 (2009) 91–96.
52. NUTRI-FACTS; ácidos grasos esenciales – 1. Disponible en internet [www.nutri-facts.org](http://www.nutri-facts.org)

53. OCAMPOS D; BETACUR L; ORTIS A; OCAMPO R. Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona muricata* L, 2007, págs 103 – 112.
54. ORDOÑES SL. Estudio e investigación del zapallo, análisis de sus propiedades, explotación y propuesta gastronómica. Ecuador, 2008. URL disponible en:  
[http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/9522/1/37306\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/9522/1/37306_1.pdf)
55. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de la Nutrición (FINUT). Estudio FAO para la Alimentación y la Nutrición “Grasa y ácidos grasos en nutrición humana, consulta de expertos”. Granada-España, 2012; 14-17. URL disponible en: <http://www.fao.org/docrep/017/i1953s/i1953s.pdf>
56. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Grasa y ácidos grasos en nutrición Humana; Granada, España, 2012
57. PERRY P. Ongoing research shows that omega-3 fatty acids help treat depression; 2005.
58. PIÑEIRO G; LAGO N; CULEBRAS JM. Papel de los ácidos omega-3 en la prevención de enfermedades cardiovasculares. *Nutr Hosp.* 2013;28(1):1-5.
59. PLANTE M; BAILEY B; ACRORTH I; CLARK D. Analysis of lipids by HPLC-CAD; 2001.
60. PRO FOUND. Investigación de mercado se Sacha Inchi, 2008.
61. QUATTROCCHI OA; ABELARIA SI; LABA EF. Introducción a la HPLC Aplicación y Practica, Argentina, Artes Gráficas Farro, primera edición, 1992.

62. REZANCA T; SCHREIBEROVÁ O; CEJKOVA A; SINGLER K. The genus *Dracunculus* – A source of triacylglycerols containing odd-numbered  $\omega$ -phenyl fatty acids; *Phytochemistry* 72 (2011) 1914–1926.
63. RIDDICK JW; BUNGER WB. *Organic solvents*, 3ra edición, Wiley-Interscience New York, New York; 1973.
64. ROCKVILLE M. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Mental Health; AHRQ Publication No. 05-E022-2.
65. RODRIGUEZ NR; BELTRAN S; JAIME I; SANZ MT; CARBALLIDO R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review; *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (2010) 1–12.
66. RUI CHEN CH; HUNG WANG CH; YA WANG-LING; HAO HONG Z; HSIU CHEN SH; JANE HO W; MINGJCH. Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil; *J. of supercritical fluids* 45 (2008), 322-331.
67. SCOTT R. *Liquid chromatography detectors*, 2da ed., journal chromatography library, vol. 33; 1986.
68. SEÑORÁNS RJ; TORRES O; *Tecnología y caracterización de los aceites comestibles*; 2007.
69. SIMOPOULOS AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60 (2006) 502–507.
70. SNYDER SL; KIRKLAND JJ. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, second edition, ISBN 0-471-03822-9.
71. STEMMLER B; *Omega 3 resumen de acciones y documentación*. - 2

72. SU KP; HUANG SY; HUNG CHIU T; HUANG KC; HUANG CL; CHANG HC; PARIANTE CM. Omega-3 Fatty Acids for Major Depressive Disorder During Pregnancy: Results From a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial; 2008.
73. SWARTZ ME; KRULL IS. Handbook of analytical validation; 2012.
74. SYDENHAM E; DANGOUR AD; LIM; WS. Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia (Review); 2012.
75. TAHA AT; METHEREL A; STARK K. Comparative analysis of standardised and common modifications of methods for lipid extraction for the determination of fatty acids, Food Chemistry 134 (2012) 427–433.
76. TELJÓN RIVERA J.M., GARRIDO PERTIERRA A. Fundamentos de la Química Estructural, 2da edición, Tébar, Madrid, 2006; 347-351. URL disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=avt8LFmp8q4C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
77. UNGER K. handbunch der HPLC, Git verlag, Heidelberg; 1986.
78. USP XXII <1225> Validation of compendial methods.
79. Validacion de Metodos Analiticos, Asociacion Española de Farmaceuticos de la Industria, sección catalana, setiembre de 1989.
80. Validation of Chromatographic Methods, 1993.
81. WANG H; SUO Y; WANG X; LI Y; YOU J; ZHAO X. Extraction of *Nitraria tangutorum* seed oil by supercritical carbon dioxide and determination of free

fatty acids by HPLC/APCI/MS with fluorescence detection; 56 (2007) 371–377.

82. WENDELL KT; FERREIRA M; MACEDO F; OLIVEIRA C; VISENTAINER JV; SOUZA NE; MATSUSHITA M. Correlation of animal diet and fatty acid content in young goat meat by gas chromatography and chemometrics; Science 71 (2005) 358–363.

83. WRIGHT SW; JEFFREY SW; MANTOURA RFC; LLEWELYN CA; BJORNLAND T; REPETA D; WELSCHMEYER N. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton; Vol. 77: 183-196, 1991.

84. YAMANE M. High-performance liquid chromatography–thermospray ionization–mass spectrometry of the oxidation products of polyunsaturated-fatty acids; Analytica Chimica Acta 465 (2002) 227–236.

85. ZHANG SH, YOU J; ZHOU G; LI CH; CUO Y. Analysis of free fatty acids in *Notopterygium forbesii* Boiss by a novel HPLC method with fluorescence detection; Talanta 98 (2012) 95–100.

#### REFERENCIAS DE INTERNET:

86. Boletín Técnico de Cultivo de Sacha Inchi, Ministerio de Agricultura.  
[http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/sacha-inchi/sacha\\_inchi.pdf](http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/sacha-inchi/sacha_inchi.pdf)

87. Descripción y Composición de la Linaza: URL:  
[http://www.flaxcouncil.ca/spanish/pdf/FlxPrmr-R11-Ch1\\_Span.pdf](http://www.flaxcouncil.ca/spanish/pdf/FlxPrmr-R11-Ch1_Span.pdf)

88. Soya Alternativa para los Sistemas de Producción de la Orinoquia Colombiana; Corpoica; pág. 58-64: 151.

<http://books.google.com.pe/books?id=lqx3S3KhcRgC&pg=PA59&dq=glycine+max+taxonomia&hl=es&sa=X&ei=YQcJUpekMqTX2QWNmIC4Cw&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=glycine%20max%20taxonomia&f=false>

