

VALIDACIÓN DE MÉTODO PARA CUANTIFICAR ESCUALENO, CAMPESTEROL,
SITOSTEROL Y ESTIGMASTEROL EN UNA MUESTRA DE ACEITE POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES

PEDRO NEL URIBE RODRÍGUEZ
TITO MONTENEGRO CASAS

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA – ECBTI
PROGRAMA DE QUÍMICA
BOGOTÁ
2020

VALIDACIÓN DE MÉTODO PARA CUANTIFICAR ESCUALENO, CAMPESTEROL,
SITOSTEROL Y ESTIGMASTEROL EN UNA MUESTRA DE ACEITE POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES

PEDRO NEL URIBE RODRÍGUEZ
TITO MONTENEGRO CASAS

Trabajo de grado modalidad proyecto aplicado para optar el título de Químico

Asesor:
Diego Ballesteros Vivas

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
PROGRAMA DE QUÍMICA
BOGOTÁ
2020

Nota de aceptación:

Firman del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del Jurado

Bogotá D.C., abril de 2020

DEDICATORIA

Dedicado a nuestra buen y gran amado señor Jesucristo, fuente de amor y fe espiritual. Y a todas a aquellas personas que él misericordiosamente pone en nuestro camino, para que logremos el éxito. Por qué de lo que si estamos seguros es que el éxito no se logra solo. Sino con disciplina, constancia y con todas aquellas contribuciones que, de cierto grado nos permiten llegar a esa meta.

AGRADECIMIENTO

A los directivos de Bio D S.A. Química Adriana Roció Márquez Jiménez (directora de inspección y ensayo). Dra. Nydia Milena Sarmiento (gerente de cultura y comunicaciones). Por darnos las herramientas y el respaldo para poder realizar el proyecto aplicado.

A la Química Luz Dary Mejía Uribe por brindarnos su gran apoyo y conocimiento como experiencia en este campo de investigación para el desarrollo del proyecto.

A nuestro asesor profesor Diego Ballesteros Vivas por su colaboración a lo largo de este proceso de educación personal y profesional. Y a todas aquellas personas que contribuyeron al cumplimiento de este objetivo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	14
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivo específicos	20
4. MARCO TEÓRICO.....	21
4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO	21
4.1.1 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO.....	21
4.1.1.1 Linealidad.....	22
4.1.1.2 Precisión.....	22
4.1.1.3 Límite de detección	22
4.1.1.4 Exactitud.....	23
4.1.1.5 Límite de cuantificación (LC)	24
4.2 ACEITES PALMA.....	24
4.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS COMPONENTES	27
4.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG).....	28
4.4.1 Temperatura de inyección	29

4.4.2 Temperatura de análisis	29
4.4.3 Optimización de flujos en capilaridad split/splitless	31
4.4.4 Modalidad split	31
4.4.5 Modalidad splitless	32
4.4.6 Flujo de fase móvil	32
4.4.7 Condiciones de las muestras a analizar	33
4.5 DETECTOR DE IONIZACIÓN EN LLAMA (FID)	34
4.6 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	35
5. METODOLOGÍA.....	37
5.1 Materiales y reactivos.....	38
5.2 Preparación de las muestras.....	38
5.3 Análisis cromatográfico (CG-FID).....	40
5.4 Trazabilidad metrológica que se realiza al equipo.....	41
5.5 Cuantificación de escualeno y esteroides	42
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
6.1 Resultados cuantificación de esteroides	48
6.2 Exactitud.....	52
6.3 Determinación de límite de detección, cuantificación y precisión.....	52
6.4 Coeficiente de correlación lineal.....	54
6.5 Rango de trabajo.....	58
6.6 Precisión.....	59
6.6.1 Repetibilidad.....	59

6.7 Sensibilidad	59
6.8 Linealidad	60
7 CONCLUSIONES.....	62
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9 ANEXOS	74
ANEXO 1. Cálculo del coeficiente de correlación lineal para la validación del estigmasterol.....	74
ANEXO 2. Cálculo del coeficiente de correlación lineal para la validación del escualeno	78
ANEXO 3. Valores de t para niveles de probabilidad.....	82
ANEXO 4. Datos estadísticos de los componentes para determinar error relativo general, desviación estándar, promedio y porcentaje de variación	83
ANEXO 5. Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases marca Shimadzu, modelo GC2010 Plus	87

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla: 1. Características físicas y actividad de fitoesteroles representativos de CPO...	28
Tabla: 2. Resumen de condiciones cromatográficas empleadas en otras investigaciones	38
Tabla: 3. Condiciones cromatográficas.....	45
Tabla: 4. Resumen de los tiempos de retención de los compuestos analizados.....	46
Tabla: 5. Datos de la preparación de las soluciones madre	47
Tabla: 6. Datos preparación de las curvas de los componentes.....	48
Tabla: 7. Datos del analista (A), para las curvas de los componentes: escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol	48
Tabla: 8. Datos del analista (B), para las curvas de los componentes: escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol	48
Tabla: 9. Rangos de áreas de la curva de calibración	51
Tabla: 10. Ensayo muestra de aceite número 283524	51
Tabla: 11. Ensayo muestra de aceite número 313519	52
Tabla: 12. Ensayo muestra de aceite número 313341	52
Tabla: 13. Estadísticas de 7 puntos por patrón de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol para determinar límite de detección, límite cuantificación, precisión y exactitud.....	56

Tabla: 14. Resultados estadísticos obtenidos para el test de linealidad. Para el analista (A)	58
Tabla: 15. Resultados estadísticos obtenidos para el test de linealidad. Para el analista (B)	59
Tabla: 16. Triplicado de la muestra 283524.....	60
Tabla: 17. Resumen condiciones del método de validación	62
Tabla: 18. Resumen de los parámetros de validación	63

RESUMEN

En el presente trabajo se validó un método para cuantificar escualeno, campesterol, sitosterol y estigmasterol en una muestra de aceite por cromatografía de gases. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un CG Shimadzu (GC2010 Plus) equipado con un sistema de inyección On-Colum-Split/Splitless, un detector FID y un automuestreador. 2,0 μ L de muestra fueron inyectados a una temperatura de 325 °C en el puerto de inyección y 50 °C de temperatura inicial en la columna. La fase móvil o gas de arrastre empleado fue helio, mientras que la columna usada fue DB5 19091J-413 (Agilent technologies 30 m \times 0,320 mm), todo el método se maneja solo en Split con presión de 91,0 Kpa, flujo total de 129,4 mL/min, flujo en columna de 6,02 mL/min, velocidad lineal de 90,5 cm/s, flujo de purga 3,0 mL/min y Split ratio 20,0. La corrida cromatográfica se llevó a cabo bajo el siguiente gradiente de temperatura 50,0 °C, 1 min, 220 °C, 0,0 min, 230,0 °C, 0 min, 280,0 °C, 0 min y 350,0 °C, 20 min. Los analitos fueron detectados empleando un detector FID a 325 °C, con una relación de aire/H₂ de 40/400 o 1/10. El procedimiento propuesto mostró comportamiento lineal evidenciando la correlación existente entre la concentración y la media del área de los picos resultantes. Se desarrollaron procesos de calibración por dos analistas diferentes obteniéndose valores de regresión adecuados (0,998-1,000). El límite de detección se determinó analíticamente por medio del límite inferior tomando como base la concentración de cada patrón de las muestras, así: para el estigmasterol: 61,43 μ g/mL,

el sitosterol: 60,11 $\mu\text{g/mL}$, el escualeno: 109,78 $\mu\text{g/mL}$ y para el campesterol: 59,90 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras calculadas presentaron una concentración muy cercana a la concentración de cada estándar. El método se evaluó por triplicado, preparando la solución en concentraciones de rango medio absorbancia media, siendo preparado por dos analistas (A y B), obteniendo un coeficiente de variación menor al 2 % y una desviación estándar de 0,27 con un resultado satisfactorio. El método propuesto en este trabajo permite validar y cuantificar escualeno, campesterol, sitosterol y estigmasterol en muestras concentradas de aceite de palma empleando la técnica CG-FID.

Palabras clave: Cromatografía de gases, escualeno, campesterol, estigmasterol, sitosterol, aceite de palma, validación analítica.

ABSTRACT

In the present work a method was validated to quantify squalene, campesterol, sitosterol and stigmasterol in an oil sample by gas chromatography. The chromatographic analysis was carried out on a Shimadzu CG (GC2010 Plus) equipped with an On-Colum-Split / Splitless injection system, an FID detector and an autosampler. 2,0 μL of sample were injected at a temperature of 325 $^{\circ}\text{C}$ and 50 $^{\circ}\text{C}$ of initial temperature in the column. The mobile phase used was helium, while the column used was DB5 19091J-413 (Agilent technologies 30 m \times 0,320 mm), the whole method is handled only in Split with 91,0 Kpa pressure, flow total of 129,4 mL/min, column flow of

6.02 mL/min, linear speed of 90,5 cm/s, purge flow 3,0 mL/min and Split ratio 20,0. The chromatographic run was carried out under the following temperature gradient 50,0 °C, 1 min, 220 °C, 0.0 min, 230,0 °C, 0 min, 280,0 °C, 0 min and 350,0 °C, 20 min. The analytes were detected using an FID detector at 325 ° C, with an air / H₂ ratio of 40/400 or 1/10. The proposed procedure showed linear behavior evidencing the correlation between the concentration and the average area of the resulting peaks. Calibration processes were developed by two different analysts obtaining suitable regression values (0,998-1,000). The limit was determined analytically by means of the lower limit based on the concentration of each standard of the samples, as follows: stigmasterol 61,43 µg/mL, sitosterol 60,11 µg/mL, squalene 109,78 µg/mL and campesterol 59,90 µg/mL. The calculated samples showed a concentration very close to the concentration of each standard. The method was evaluated in triplicate, preparing the solution in mid-range concentrations, medium absorbance, being prepared by two analysts (A and B), obtaining a coefficient of variation of less than 2 % and a standard deviation of 0,27 with a satisfactory result. The method proposed in this work allows to validate and quantify squalene, campesterol, sitosterol and stigmasterol in concentrated samples of palama oil using the CG-FID technique.

Key words: Gas chromatography, squalene, campesterol, stigmasterol, sitosterol, palm oil, analytical chemical validation.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se desarrolla como proyecto aplicado en el área de control de calidad de la empresa BIO D, la cual es líder en bio soluciones responsables a partir de aceite de palma y contempla dentro de sus funciones ofrecer productos de alta calidad y confiables.

BIO D S.A., es una planta de producción de biodiesel la cual se construyó en el municipio de Facatativá cuenta con una producción de 600 toneladas de biodiesel por día. Es una empresa colombiana y se considera una de las más modernas del país y de mayor capacidad en producción de biodiesel en el país. Está orientada a la transformación del aceite de palma a biodiesel, a través de una serie de procesos continuos de gran calidad, enfocándose en la producción de biodiesel certificado por la ISO 90001, 14001 y OHSAS 18001, suplementos energéticos para animales en producción, materia prima para la elaboración de productos de aseo de origen vegetal 100 % biodegradables y producción del metil oleato, una materia prima novedosa y biodegradable como sustituto de diluyentes tradicionales y peligrosos para la salud.

El desarrollo e implementación de métodos para cuantificar fitonutrientes o compuestos menores es una de las necesidades más importantes de las empresas productoras de aceite de palma a fin de mejorar sus procesos de calidad. En este sentido, resulta de gran importancia la implementación de un método para cuantificar fitonutrientes o componentes menores en muestras de aceite de palma.

Con el fin de implementar un mejor proceso se ha validado un método de cuantificación de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol de una muestra de aceite de palma con el equipo cromatógrafo de gas marca shimadzu, modelo Gc2010 Plus, con sistema de inyector on-column - split/splitless y dos detectores FID.

Lo desarrollado en el presente proyecto ayuda a Bio D a maximizar la utilidad del cromatógrafo Shimadzu Gc2010 Plus mediante la implementación del método para cuantificar escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol en una muestra de aceite de palma, el equipo queda en un funcionamiento óptimo para desarrollar la técnica analítica estandarizada, esto contribuirá con soporte técnico en la identificación del mejor producto de aceite de palma.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Bio D S.A. es una moderna industria colombiana dedicada a la producción y transformación de biodiesel. Entre las actividades de Bio D se encuentra la producción de biodiesel (proceso certificado con ISO 90001, 14001 y OHSAS 18001), con más de 600 toneladas/día, la fabricación de suplementos energéticos para animales, así como de materias primas para la elaboración de productos biodegradables de aseo y de disolventes alternativos como el oleato de metilo. Adicionalmente, Bio D está transformando materias primas no convencionales, como el aceite vegetal de cocina, para el desarrollo de sus productos.

Parte fundamental del desarrollo de valor agregado en los productos de Bio D es la caracterización, identificación y cuantificación de moléculas de valor funcional en las materias primas y en los productos terminados de esta empresa. Los fitoesteroides, tales como de escualeno, campesterol, sitosterol y estigmasterol, son esteroides de origen vegetal de gran interés biológico, los cuales se encuentran presentes en aceites vegetales. La determinación de estos compuestos menores es de gran importancia para la consolidación de valor agregado. Por tal motivo, el desarrollo de estrategias analíticas que permitan la determinación rápida y confiable de este tipo de compuestos es una necesidad para la empresa. Adicionalmente, Bio D cuenta con la infraestructura suficiente para tal desarrollo, como es el caso del cromatógrafo de gas Shimadzu GC2010 Plus (GC) con sistema de inyector on-column - split/splitless y dos detectores FID. Sin embargo, hasta ahora en Bio D no se ha implementado ni validado ningún

método analítico en el que se use el GC-FID para los fines descritos. Por estas razones y atendiendo a las necesidades particulares de la empresa, el presente proyecto aplicado pretende resolver tal problemática desarrollando y validando un método analítico para la cuantificación de los fitoesteroles señalados en aceites de palma empleando el GC-FID descrito.

2. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento del contenido exacto de fitonutrientes en aceites vegetales podría incrementar su valor comercial, por tal razón la implementación de métodos de cuantificación de compuestos menores es una necesidad fundamental que podría transformar a las industrias productoras tradicionales de aceite vegetales a industrias suministradoras de aditivos naturales para la industria agroalimentaria, cosmética y farmacéutica.

La organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO, por sus siglas en ingles) y la organización mundial de la salud (OMS) (1994) han recomendado proveer de forma amplia la información que se relaciona con la composición de alimentos referidos a las grasas y a los análisis sobre el contenido de ácidos grasos en los alimentos; y en la elaboración de bases de datos acerca de los nutrientes, donde se empleen métodos normalizados y estándares. Este informe ofrece una buena cobertura de las sustancias y las características nutricionales de interés (Christie, 2003).

Cabe destacar y resaltar que los aceites comestibles cumplen actualmente un papel importante en la alimentación de la población mundial ya que son ricos en calorías e influyen en el organismo de forma positiva cuando su consumo es adecuado en términos nutricionales. Especialmente los aceites que son ricos en fitonutrientes, poco disponibles en otros alimentos, por su actividad biológica (antioxidantes y antiinflamatorios) además del balance entre ácidos grasos saturados e insaturados,

tienen propiedades que promueven la salud humana y ayudan a prevenir riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y envejecimiento. Actualmente y pese a los beneficios mencionados de los fitonutrientes en los aceites, muchas empresas optan por no cuantificarlos puesto que la mayor parte se destruyen durante el proceso de refinación tradicional. Por lo tanto, es indispensable implementar un método para cuantificarlos de forma segura y eficiente. Muchos productores optimizan sus propios procesos de producción y refinación para extraer de los ácidos grasos destilados o del propio aceite crudo la mayor parte de sus fitonutrientes. Son muy pocas las empresas que están avanzando en el desarrollo oleoquímicos, ni tampoco extraen las vitaminas y fitonutrientes del aceite. (Ferrero, 2017)

La identificación de fitonutrientes en las muestras de aceite de palma le permitiría a la empresa Bio D beneficiarse económicamente con esta explotación integral y podría entrar en el negocio de la extracción de las vitaminas, y poner la tecnología al alcance con el fin de producir aditivos funcionales naturales.

Las tecnologías de extracción actuales permiten obtener aceites con rendimientos cercanos al 85% y considerando el contenido de fitonutrientes se estima que una industria que procese alrededor de 20 toneladas de ácidos grasos/día podría generar un volumen de negocios anuales de 50 millones de dólares (Ferrero Consuelo, 13 de febrero de 2017). El camino hacia la explotación de este potencial comercial inicia con la validación de un método analítico para la cuantificación de fitonutrientes en aceites de palma, como lo es el objeto de este proyecto aplicado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Validar un método de cuantificación de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol en muestras de aceite por cromatografía de gases.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el contenido de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol, así como de los componentes menores en muestra de aceite de palma.
- Estandarización del método para la cuantificación de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol en una muestra de aceite de palma.
- Identificar las curvas de calibración para los patrones de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol en una muestra de aceite de palma.
- Asegurar la confiabilidad de los resultados mediante los parámetros de validación de los analitos de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol en una muestra de aceite de palma.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La norma técnica colombiana NTC-ISO/IEC 17025 (2017) afirma “El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados.

El Laboratorio debe conservar los siguientes requisitos de validación:

- El procedimiento de validación utilizado.
- Las especificaciones de los requisitos.
- La determinación de las características de desempeño del método.
- Los resultados obtenidos.
- Una declaración de la validez del método, detallando su aptitud para el uso previsto”.

4.1.1 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

La estandarización requiere de información primaria, definición del sistema preliminar y ajustes de los parámetros analíticos. La estandarización también hace referencia al control químico de calidad que está relacionado con los siguientes parámetros: linealidad, especificidad, precisión, exactitud y sensibilidad. Así mismo, los resultados de los análisis deben mostrar que la metodología es específica, selectiva,

precisa y lineal en el rango de determinación (Garzón y Popayán, 2007). Los parámetros mencionados se definen a continuación:

4.1.1.1 Linealidad

Está relacionada con la capacidad de un método analítico en su habilidad para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango dado. Su evaluación se realiza mediante la preparación y análisis, por triplicado, de disoluciones estándares en varios niveles de concentración (Díaz, 2006).

4.1.1.2 Precisión

Comprende la función de la variabilidad de las mediciones, esta se calcula en términos del porcentaje de desviación estándar relativa a partir de los resultados obtenidos. (Rodríguez, Amaya, Caballero, Alanís, Aguilera, Báez, Moreno, y Núñez, 2014). Su objetivo de estudio es conocer la variabilidad o la incertidumbre del método de ensayo. Sin embargo, este parámetro no hace referencia a la cercanía del valor experimental del verdadero, por lo que se pueden tener mediciones muy precisas, pero poco exactas.

4.1.1.3 Límite de detección

El límite de detección (LD) de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en la muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado con exactitud (Díaz, 2006).

Miller, N y Miller, J. (2002) establecen textualmente que “En términos generales, el límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento y significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo”. Esta descripción proporciona al analista un buen margen de libertad para decidir la definición exacta del límite de detección. Sin embargo, LD puede asumirse como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

4.1.1.4 Exactitud

Según Cardona, Chaparro, Calderón, Peláez y García, (2011) la evaluación de la exactitud del método se basa en la recuperación de cantidades conocidas en las muestras con tres concentraciones diferentes, las cuales pueden ser analizadas por triplicado de acuerdo con las condiciones óptimas. Coy (2006) define que es la proximidad entre el valor medio obtenido de un conjunto de resultados y el valor de referencia aceptado; normalmente se expresa en términos de error relativo.

Según la Oficina de la Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC, 2010), lo más usual corresponde a estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta.

4.1.1.5 Límite de cuantificación (LC)

Corresponde a la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud de acuerdo con el tipo de determinación. Se considera como la concentración típica que produce una señal 10 veces superior a la desviación estándar del blanco (Giraldo, 1999).

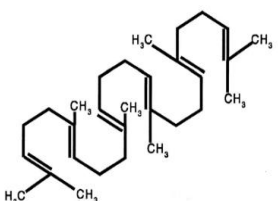
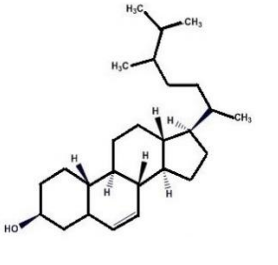
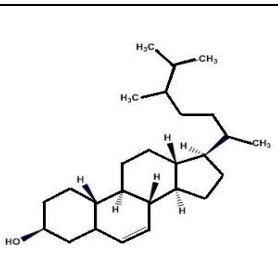
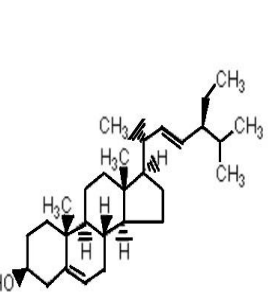
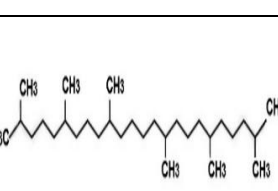
4.2 ACEITE DE PALMA

La palma africana de aceite (*Elaeis guineensis*) es una planta tropical de clima cálido que crece por debajo de los 500 msnm. El cultivo de esta palma de origen africano se ha difundido ampliamente en el territorio nacional desde su introducción a Colombia en el siglo XIX (Cenipalma, 2013). El aceite crudo de palma (CPO) se obtiene a partir del mesocarpio de la fruta de palma. CPO es una rica fuente de vitaminas A y E por lo que es de interés para el desarrollo de cosméticos y productos alimenticios, sin embargo, su uso más común es como materia prima en la producción de biodiesel (Agropalma, 2013). Adicionalmente, CPO es una fuente importante de fitoquímicos muchos de los cuales son compuestos bioactivos, entre ellos: fitoesteroles, fitoestrógenos, flavonoles, carotenoides y tocoferoles, los cuales aportan beneficios a la salud por sus propiedades nutricionales y en la prevención de enfermedades (Duran, Torres y Sanhueza, 2015). CPO también está compuesto por triglicéridos y ácidos grasos libres, como los ácidos oleicos (36-44%), linoleico (9-12%), palmítico (39,3-47,5%) y esteárico (3,5-6%) (Rincón y Martínez, 2009).

La obtención de CPO a partir de los frutos frescos de *E. Guineensis* comprende varios pasos importantes como: esterilización, separación, prensado, clarificación y recuperación de los palmistes (Woob y Beattle, 1982).

La calidad de CPO está determinada por el punto de fusión, el índice de refracción, los ácidos grasos libres, el índice de deterioro a la blanqueabilidad, el índice de yodo, el perfil de ácidos grasos, el contenido de carotenos y de vitamina E (Delgado, Echeverry y Suárez, 2004), así como de otros componentes menores. Entre estos componentes se encuentran los esteroides vegetales de los cuales se han descrito más de 200 sustancias en diferentes especies vegetales, así como en sus órganos. El esteroide más abundante es el sitosterol o β -sitosterol, seguido por el campesterol y el estigmasterol (Oliver, Segura, Bonet, Oliver, Serra, Rodríguez y Ribot, 2005). Los esteroides vegetales se clasifican en fitoesteroides y fitoestanoles y su estructura química es similar, con la diferencia de que los esteroides cuentan con un doble enlace en posición 5 (Meco, Pascual y Alberich, 2016). Los esteroides vegetales son miembros de la familia de los triterpenos, su estructura es similar a la del colesterol, pero incluye un grupo metilo o etilo en C-24. Los estanoles que no cuentan con dicho doble enlace presentan reducción-5 α (Oliver et al., 2005). A continuación, se resumen algunas características de cinco de los fitoesteroides más comunes y que son objeto del presente estudio:

Tabla: 1. Características físicas y actividad de fitosteroles representativos de CPO (Meco et al, 2016).

Compuesto	Estructura	Características	Actividad
Escualeno		Fórmula Molecular: C ₃₀ H ₅₀ Peso Molecular: 410.71 g/mol Punto de Ebullición: 275 °C Nombre IUPAC: (2E,6E,10E,14E,18E)- 2,6,10,15,19,23-Hexametil- 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno	Antioxidante, humectante, emoliente (Rodríguez et al., 2014).
Campesterol		Fórmula Molecular: C ₂₈ H ₄₈ O Peso Molecular: 400.68 g/mol Punto de fusión: 157 °C Nombre IUPAC: (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17- [(2R,5R)-5,6-dimethylheptan-2-yl]- 10,13-dimethyl- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- dodecahydro-1H- cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	Tiene efectos hipocolesterolémico y efectos benéficos en el tratamiento de la inflamación benigna de la próstata. (Valenzuela y Ronco, 2004).
Sitosterol		Formular molecular: C ₂₉ H ₅₀ O Peso molecular: 414.71 g/mol. Punto de fisión: 140 °C Denominación de la IUPAC: 17- (5-Ethyl-6-methylheptan-2-yl)- 10,13-dimethyl- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- dodecahydro-1H- cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	Tiene actividad anticancerígena, prevención de la enfermedad del hígado graso no alcohólico y una mejor actividad reductora del colesterol. (Yuan, Zhang, Long, Jin y Jin Risheng, 2019)
Estigmasterol		Formular molecular: C ₂₉ H ₄₈ O Peso molecular: 412.69 g/mol Punto de ebullición: 164 K (-109 °C). Nombre IUPAC: (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17- [(E,2R,5S)-5-ethyl-6-methylhept-3- en-2-yl]-10,13-dimethyl- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- dodecahydro-1H- cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	Antiosteoartrítica, antihipercolesterolémica, citotóxica, antitumoral, hipoglucemiante, antimutagénica, antioxidante, antiinflamatorio (Kaur, Chaudhary, Jain y Kishore, 2011).
Escualano		Fórmula Molecular: C ₃₀ H ₆₂ Peso Molecular: 422.81 g/mol Punto de ebullición: 350 °C Nombre IUPAC: 2,6,10,15,19,23- hexametiltetracosano	Funciona en la piel como un recolector de radicales de oxígeno, protegiendo de ese modo a la piel de la peroxidación lipídica debida a la exposición a rayos UV y otras fuentes de radiaciones ionizantes. (Ronco, 2009)

4.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS COMPONENTES

La cromatografía de gases es una técnica de separación de analitos que permite identificar y cuantificar un gran número de compuestos. Para la cuantificación de compuestos, existen diversas técnicas como la normalización de áreas, el método de patrón externo o el método de patrón interno. Cuando se quiere cuantificar un compuesto presente en una muestra por el método del patrón interno, hay que preparar una serie de disoluciones de concentraciones crecientes, del patrón correspondiente al compuesto a cuantificar, tener un intervalo de concentraciones y añadir a cada uno de los patrones y a la muestra una misma cantidad o concentración de patrón interno.

El patrón interno ha de ser un compuesto de naturaleza similar al analito a determinar, pero que no esté presente en la muestra. (Fernández y García, 2012). Para usar un patrón interno, se prepara primero una mezcla conocida de patrón y analito, y luego se mide la respuesta relativa del detector a las dos especies. En el cromatograma el área debajo de cada uno de los picos es proporcional a la concentración de las especies inyectadas en la columna. (Harris, 2007).

El patrón interno (PI) no tiene que estar presente en las muestras, presentar características, concentración y comportamiento análogo al del analito, no debe reaccionar con los componentes de la muestra ni interferir en el análisis y tiene que representar el cociente entre la señal de patrón y la del patrón interno frente a la concentración. (Díaz y Ferreira, 2011).

En los parámetros de calidad las condiciones más favorables para efectuar una medida se tendrán a relaciones de señal/Ruido (S/R) altas ($S/R \geq 3$). Se establece una relación $S/R=3$ para calcular el límite de detección. Se establece una relación $S/R=10$ para calcular el límite de cuantificación. (Diaz y Ferreira, 2011).

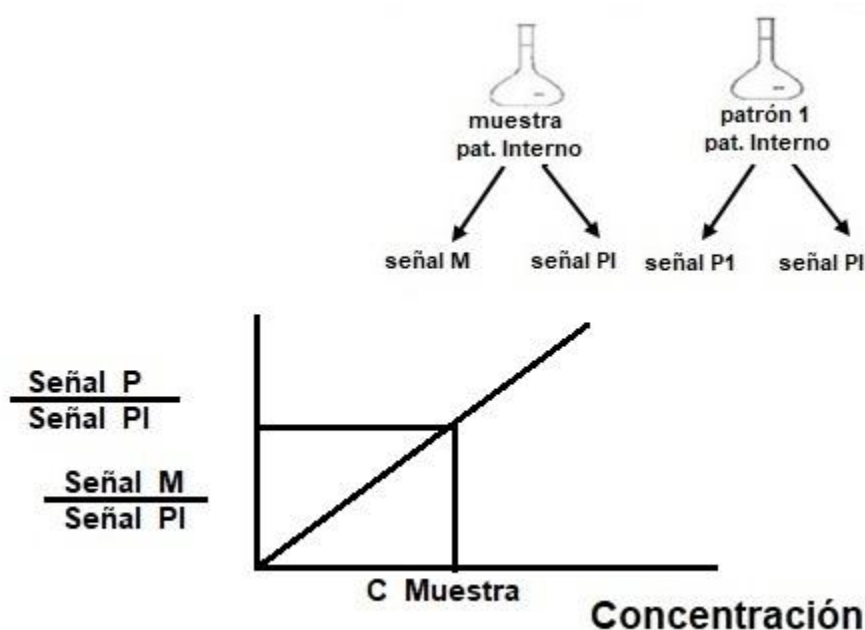


Figura: 1. Esquema de elaboración de la calibración con patrón interno. Tomada de, (Diaz y Ferreira, 2011)

4.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

La cromatografía de gases es una técnica de análisis donde los componentes de una mezcla se separarán al distribuirse entre dos fases: la fase estacionaria y fase móvil. La fase móvil es en general gaseosa, esencialmente inerte, y se mueve a través

del lecho de la fase estacionaria al interior de la columna durante el proceso cromatográfico (Quirantes, Domínguez, Segura y Fernández, 2015).

Los primeros en utilizar un gas como fase móvil fueron A. T. James y A. J. Martin en 1952, para separar ácidos grasos cortos. Posteriormente Dabrio, en 1971, la utilizó para separar metilaminas, aminas alifáticas y homólogos de piridina (Olguín y Rodríguez, 2004).

4.4.1 Temperatura de inyección

La gran cantidad de muestras son inyectadas por medio de la jeringa hipodérmica, a un alineador de vidrio contenido en un bloque metálico donde la temperatura de inyección se fija en un valor suficientemente alto para convertir la muestra líquida de forma instantánea en vapor, la cantidad de la muestra inyectada es del orden de μL para líquidos y algo superior para gases.

4.4.2 Temperatura de análisis

En los distintos procesos de análisis las muestras suelen tener gran cantidad de componentes, y resulta difícil dar con las condiciones únicas que permitan obtener todos los picos de los analitos y la cuantificación de estos. Una solución consiste en combinar las condiciones que afectan las muestras mientras se produce la separación. Por medio de la cromatografía de gases es posible trabajar con un incremento de temperaturas lo que permite conseguir condiciones óptimas para las separaciones y cuantificaciones.

Hay que tener en cuenta que los límites de temperatura del líquido elegido, considerando su viscosidad y volatilidad. Un descenso en la temperatura de la columna aumenta el tiempo de retención de los solutos y en ocasiones puede mejorar las separaciones. Pero cuando la viscosidad de la fase estacionaria se hace demasiado alta, o se alcanza el punto de fusión, generalmente la eficacia de la columna baja enormemente (Olquín y Rodríguez, 2004).

La programación automática de presión a la temperatura mejora dramáticamente la separación, reduce el tiempo de corrida y se obtiene una velocidad óptima lineal para el soluto. Durante una corrida se pueden realizar cambios en temperatura y tiempos determinados. Para una mejor optimización, es posible:

1. Seleccionar columnas que tengan mayor eficiencia que la requerida para la separación.
2. La temperatura del horno inicial podría ser lo suficientemente baja como para permitir separar componentes de bajo punto de ebullición, pero más alta que la temperatura mínima para la fase estacionaria de la columna.
3. Correr mezclas complejas en temperaturas iniciales bajas para dispersar los picos.
4. Siempre introducir un tiempo de sostenido inicial para soluto de rápida elución.
5. Incrementar las rampas de presión y temperatura para reducir los espacios en blanco entre grupos. Comenzar con rampas de temperatura. Si los últimos picos de elución son

resueltos pobremente, reducir la temperatura e incrementar la presión (Olquín y Rodríguez, 2004).

4.4.3 Optimización de flujos en capilaridad split/splitless

El proceso de la cromatografía de gases se optimiza cuando la sensibilidad y resolución de las mezclas complejas es activado en el menor tiempo posible. Para lograr esta calibración hay que tener en cuenta que:

Las soluciones estándar de diferentes concentraciones son lineales, los estándares a las mismas concentraciones se reproducen en un periodo de tiempo específico, y los bajos niveles de concentración de picos tempranos y tardíos, acompañados con el menor ruido.

Cumpliendo con este procedimiento es posible tener un sistema optimizado. Un cambio directo en el flujo puede modificar completamente la forma de los picos y alterar toda la eficiencia de la columna (Olquín y Rodríguez, 2004).

4.4.4 Modalidad split

En este proceso se introduce solo una cantidad pequeña de la muestra en la columna, se utiliza para las distintas muestras concentradas, en este modo se producen picos estrechos afilados. Es adecuado para el análisis de componentes mayoritarios. Al trabajar en este modo el inyector divide las muestras vaporizadas en dos partes: una minoritaria que pasa a la columna y otra mayoritaria que se expulsa del inyector por la

válvula de split. Esta inyección evita sobre cargar la columna y cualquier efecto negativo en el análisis.

4.4.5 Modalidad splitless

Se introduce la totalidad de muestra muy poco concentrada en la columna, en estos casos los picos obtenidos son más dispersos que los de la modalidad split. Se utiliza para los análisis de componentes traza. Durante el muestreo con splitless, la muestra se inyecta dentro de la columna caliente y forma un vapor que consiste en muestra, solvente y gas. Parte del gas sale por el respirador al pasar en el alineador. El muestreo con splitless puede ser optimizado usando “concentración de muestra / solvente” para volver a concentrar la muestra en la columna caliente. Esta técnica es extremadamente útil para mejorar la resolución de los picos y eliminar las trazas de solvente y la interferencia de vapor retenido momentáneamente en la fase estacionaria. (Olquín y Rodriguez, 2004).

4.4.6 Flujo de fase móvil

La clave de la separación en cromatografía es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (equilibrio de distribución). En el caso de la cromatografía de gases la fase móvil es un gas inerte (helio o nitrógeno) y la fase estacionaria es un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido “sostenido” por un sólido inerte (cromatografía gas-líquido). Este tipo de

cromatografía siempre es en columna, ya que es la única manera de que la fase móvil gaseosa se mantenga fluyendo, confinada dentro del sistema. La columna puede estar rellena con la fase estacionaria, o bien la fase estacionaria puede depositarse sobre las paredes de un tubo muy delgado (0,25 mm de diámetro) y largo (hasta 100 m). Este tipo de columnas se conocen como columnas capilares y proporcionan la mayor capacidad de separación. (Pássaro, Rivera, Román, Cardona, Muñoz, Gómez, Quiceno y Rojas, 2016).

La fase móvil debe tener las siguientes características:

No contener partículas en suspensión, para ello se requiere una filtración previa a su utilización (filtro de 0,2 μm). Alta pureza, puesto que las impurezas degradan la columna e interfieren en la medida. La presencia de gases disueltos (O_2 y N_2) en la fase móvil pueden originar problemas (reacciones indeseables entre los gases y los compuestos de la muestra, irregularidades en el flujo dentro de la columna que reducen la eficacia y la reproducibilidad de la separación, variaciones en las respuestas del detector que produce cambios en la línea base del cromatograma). Por ello la fase móvil debe ser desgasificada mediante alguno de los siguientes sistemas: vacío moderado, ultrasonidos, burbujeo de una corriente de gas inerte (helio) a través del disolvente. Este tratamiento elimina los gases además de la materia en suspensión. (Díaz y Ferreira, 2011)

4.4.7 Condiciones de las muestras a analizar

Los compuestos analizados en este trabajo son volátiles. Para disminuir la

contaminación en el análisis evitamos utilizar el proceso de derivatización ya que el reactivo que se emplea para esta reacción está disuelto en piridina, por ende, se utiliza el escualano que lo disolvemos en heptano, con este procedimiento se consiguen áreas bien definidas. Al derivatizar generalmente se realiza en presencia de piridina que actúa como solvente y como catalizador, en las muestras se produce un pretratamiento de sustancia que tiene volatilidad más rápida y la respuesta analítica se produce en menor tiempo, pero se generan residuos tóxicos como la piridina. (Jalocha y Gómez, 2002).

La piridina es un solvente básico y de olor repugnante. Debe ser tratado como un solvente altamente tóxico; causa depresión del sistema nervioso central, irritación de la piel y del extracto respiratorio, daño al hígado, riñones, sistema gastrointestinal y puede causar esterilidad temporal. (Betancur, Ocampo D, Ocampo R y Ríos, 2008).

4.5 DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)

Es el más usado, cuando un compuesto orgánico se quema en una llama H_2 -aire se producen iones y electrones que conducen electricidad. Si se aplica una diferencia de potencial entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado sobre la llama, la corriente producida por los iones se dirige a un amplificador operacional. El número de iones producido es proporcional al número de átomos de carbono reducidos en la llama por unidad de tiempo, es sensible a la masa no a la concentración. Los grupos funcionales como halógenos que no originan iones, los gases no combustibles como H_2O , SO_2 , CO_2 , NO_x no son detectados. Un FID tiene las siguientes características (Barqueros, 2006):

- El número de iones que se produce es proporcional al de átomos de carbono transformados en la llama.
- Es sensible a la masa e insensible a sustancias inorgánicas y a grupos funcionales tales como CO, halógenos o amina porque no originan iones.
- Tiene alta sensibilidad de 10^{-13} g
- Presenta intervalos lineales de respuesta, bajo volumen efectivo, es resistente, pero destruye la muestra.

4.6 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

La búsqueda bibliográfica y el análisis de la literatura permitió encontrar varios trabajos en los que se empleó CG para la determinación y cuantificación de fitoesteroles en matrices de diferentes orígenes. A partir de esta información se construyó la tabla 2, en la que se resumen las condiciones cromatográficas empleadas y otra información relevante, a partir de la cual se plantearon las condiciones del presente trabajo.

Tabla: 2. Resumen de condiciones cromatográficas empleadas en otras investigaciones.

Técnica cromatográfica	Detector	Condiciones cromatográficas	Gas de arrastre	Temperatura inyector	flujo	columna	Programa de temperatura	Compuestos analizados	matriz	Parámetros estadísticos evaluados	Referencias
Cromatografía de gases	Ionización de llama	Split/splitless	Helio	310 °C	Flujo total 45 mL/min, flujo de columna 1 mL/min	Columna MXT5 serie 508529G1 (30m de longitud x 0.25mm I.D. 0,5µm de espesor de película	Temperatura de la columna 250 °C durante 5 minutos, después se llevó hasta 280 °C con razón de 40 °C/min durante 25 minutos, como detector se empleó espectrómetro de masas MS-UP2010 system, con una temperatura del detector: 260 °C	fitoesteroles en matrices oleosas	β-sitosterol y estigmasterol	Precisión, límite de detección y cuantificación, sensibilidad, linealidad y exactitud	Arias, Gil y Arrubla (2013)
Cromatografía de gases	Espectrómetro de masas 5973N	Split/splitless	Helio	270 °C	Flujo de 0.8 mL/min	Columna capilar HP 5MS:30m*0.25mm*0.25µm	Temperatura de la columna 190 °C, se mantuvo por 1 min, después se alcanzó la temperatura de 300 °C con una rampa de 15 °C, se mantuvo por 10 min	fitoesteroles	Escualeno, β-sitosterol, campesterol y estigmasterol	Incertidumbre, Límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud	(Rodríguez et al., 2014).
Cromatografía de gases	Ionización de llama	Split/splitless	Helio	300 °C	Flujo total 45 mL/min, flujo en la columna 4 mL/min	Columna MXT-5 serie 951048 (30m de longitud x 0.5mm ID, 0.5 µm de espesor de película).	Temperatura de la columna 250°C durante 2 minutos, después se llevó hasta 280°C con razón 40°C/min, se mantuvo así durante 10 minutos, después se llevó hasta 300°C con razón de 10°C/min y se mantuvo por 5 minutos	Fitoesteroles en la semilla de Persea Americana Miller variedad Lorena	5α-colestano, ergosterol, estigmasterol y colestano	Coefficiente de correlación, coeficiente de variación estándar, Límite de detección, Límite de cuantificación y sensibilidad, precisión, reproducibilidad y repetibilidad	(Barrera y Arrubla, 2017).

5. METODOLOGÍA

El objetivo de este trabajo es validar un método para cuantificar escualeno, campesterol, sitosterol y estigmasterol en una muestra de aceite de palma por cromatografía de gases CG, en un laboratorio del área de control de calidad de la empresa BIO D. Para ello es necesario realizar las curvas de calibración de cada compuesto, donde los resultados de los coeficientes de determinación deben ser cercanos a uno (1) en todas las curvas y demostrar linealidad adecuada. Para la confirmación de la linealidad del método se comprobará la prueba estadística test student, en un nivel de confianza del 99% (probabilidad $p = 0,01$) $n=7-2= 5$ grados de libertad, que permita comprobar nuestra prueba de linealidad de un 99%. También se validarán los parámetros estadísticos de precisión, linealidad, sensibilidad, repetibilidad y exactitud con porcentaje de error relativo general menores al 5% para esta clase de investigaciones. Para el límite de detección y límite de cuantificación se prepararán (7) siete patrones de concentración conocida por cada componente. Los resultados se comprobarán analíticamente por medio del límite inferior, tomando como referencia la concentración de cada patrón de las muestras. Y por último los componentes calculados, deberán presentar una concentración muy cercana a la concentración de cada patrón ($\mu\text{g/mL}$). Para de esta forma poder comprobar cuales son las concentraciones mínimas que se pueden trabajar para que los resultados analíticos sean confiables

5.1 Materiales y reactivos

Los estándares de referencia utilizados fueron escualano 97,8% (LRAB9047 SIGMA), escualeno 99% (LRAB7475 SIGMA), campesterol 96% (1002772990 SIGMA), estigmasterol 95,5% (101978650 SIGMA), sitosterol 95,3% (12730 SIGMA), *n*-heptano (10959290 823 Merck) y cloroformo (K51085045 908 Merck) este último fue usado como solvente para diluir los estándares de la solución madre.

5.2 Preparación de la muestra

Las muestras analizadas en este trabajo fueron proporcionadas por Bio D S.A. y los detalles de su obtención industrial son parte de desarrollos propios de la empresa y sujetos de la debida confidencialidad. Las muestras analizadas corresponden a concentrados de aceites ricos en fitoesteroles, las cuales fueron obtenidas siguiendo el esquema ilustrado en la Figura 2.



Figura: 2. Procesos unitarios para obtener aceites concentrados de fitoesteroles.

La muestra de aceite concentrado se le realiza prueba de tacto donde se comprueba que presenta una textura semisólida, densa y de color rojo oscuro como se observa en la Figura 3.

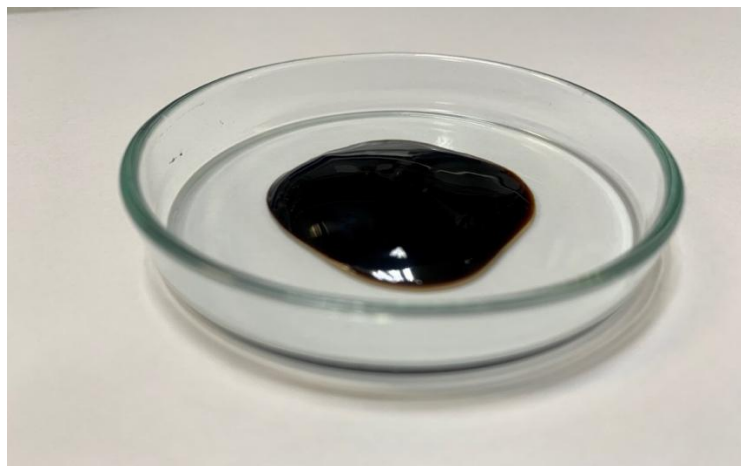


Figura: 3. Aceite concentrado en fitoesteres.

Las características de las muestras implicaron tratamientos adicionales antes del análisis cromatográfico, los cuales son esquematizados en la Figura 4.

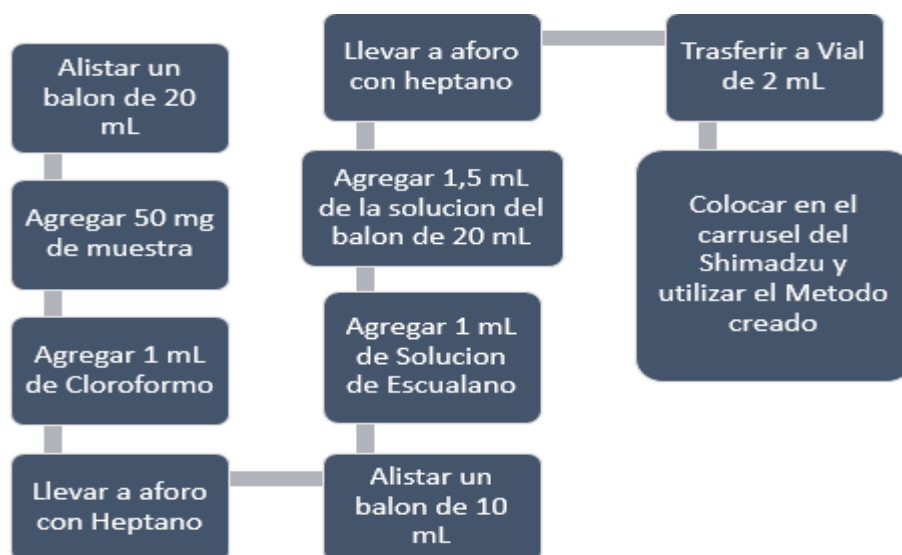


Figura: 4. Tratamientos previos de los aceites concentrados al análisis cromatográfico.

En el presente estudio se trataron y analizaron tres muestras (283524, 313341 y 313519) que difieren en los días de su producción y en las concentraciones de componentes menores (escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol).

5.3 Análisis cromatográfico (CG-FID)

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un CG Shimadzu (GC2010 Plus) equipado con un sistema de inyección On-Colum-Split/Splitless, un detector FID y un automuestreador. 2,0 μ L de muestra fueron inyectados a una temperatura de 325 °C en el puerto de inyección y 50°C de temperatura inicial en la columna. La fase móvil o gas de arrastre empleado fue helio, mientras que la columna usada fue DB5 19091J-413 (Agilent technologies 30 m \times 0,320 mm \times 0,25 μ m), todo el método se maneja solo en Split con presión de 91,0 Kpa, flujo total de 129,4 mL/min, flujo en columna de 6,02 mL/min, velocidad lineal de 90,5 cm/sec, flujo de purga 3,0 mL/min y Split ratio 20,0. La corrida cromatográfica se llevó a cabo bajo el siguiente gradiente de temperatura 50,0 °C, 1 min, 220 °C, 0,0 min, 230,0 °C, 0 min, 280,0 °C, 0 min y 350,0 °C, 20 min. Los analitos fueron detectados empleando un detector FID a 325 °C, con una relación de aire/H₂ de 40/400 o 1/10. Una fotografía del cromatógrafo empleado se muestra en la Figura 5.



Figura: 5. Equipo de cromatografía de gases marca Shimadzu, modelo GC2010 Plus

5.4 Trazabilidad metrológica que se realiza al equipo

La calibración del equipo Shimadzu GC2010 plus se establece en un plan de mantenimiento, verificación y calibración del equipo que son realizadas por un laboratorio externo con trazabilidad nacional (PAF) y acreditado en las medidas de su existencia en el país; los certificados emitidos por estos proveedores deben cumplir los requisitos aplicables de la norma ISO/IEC 17025:2017. Todas las calibraciones deben ser tratables al sistema internacional de unidades (SI) o a los materiales de referencia adoptados internacionalmente para tal fin. También las calibraciones que realiza el propio proceso de inspección y ensayo se identifican en el plan de mantenimiento, verificación y calibración del equipo y se realiza siempre con patrones debidamente trazables.

De igual forma la calibración realizada por laboratorio externo se realiza cada año, si el equipo o antes según sea requerido, y la calibración por parte del propio proceso se realiza con un conteo interno de 200 inyecciones que presenta el equipo o antes si según sea necesario.

5.5 Cuantificación de escualeno y esteroides

Los fitoesteroides se determinaron mediante el método del patrón interno, usando escualano y se empleó la ecuación 1 para la cuantificación de dichas sustancias. El método de cuantificación se basa en la pendiente e intercepto obtenidos por la curva de calibración

$$\%ESTEROL = (wEsc / ag) \times ((Es / AEs) - bg) \times (100/w) \quad \text{Ecuación 1}$$

Para obtener la cantidad de esteroides en su totalidad los porcentajes de los compuestos campesterol, estigmasterol y sitosterol fueron sumados (Ecuación 2), mientras que el contenido de escualeno fue reportado de manera independiente.

$$\%ESTEROL \text{ TOTALES} = \sum Esterol \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

Es: Área del esteroide

AEs: Área del pico del Escualano, estándar interno

wEsc: μg de Escualano

w: μg de la muestra

ag: Pendiente de la curva de calibración

bg: Intercepto de la curva de calibración

Esc: Escualano.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se validó un método analítico mediante CG-FID para la determinación de componentes menores en aceites concentrados usando **escualano** como patrón interno. Las condiciones instrumentales óptimas se resumen en la Tabla 3.

Tabla: 3. Condiciones cromatográficas.

Columna	HP-5 19091J-413 (30m X 0,320mm X 0,25µm)		
SPL			
Split	Temperatura 350°C	Presión: 91 kPa	Flujo de Purga: 3,0
Programación Horno			
Rate	Temperatura	Sostener Tiempo	Tiempo total
Inicia	50°C	1	51 minutos
20	220°C	0	
1	230°C	0	
5	280°C	0	
30	325°C	20	
FID			
Temperatura 325°C	Flujo Makeup 30mL/min	Flujo Helio 40mL/min	Flujo Aire 400mL/min

Los tiempos de retención para los componentes empleados se obtuvieron a partir de múltiples corridas cromatográficas. El cromatograma obtenido con las mejores condiciones de resolución se muestra en la Figura 6 y los tiempos de retención se resumen en la Tabla 4.

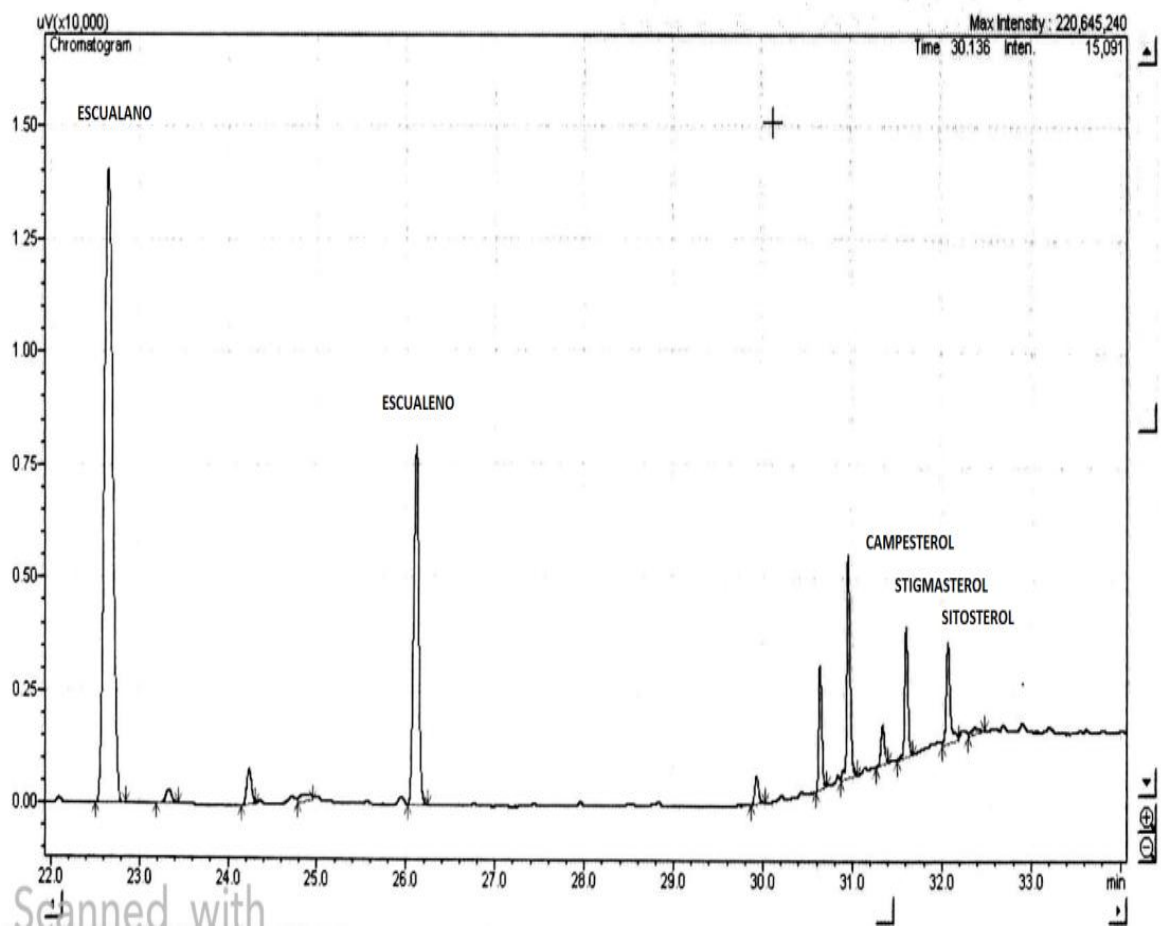


Figura: 6. Tiempos de retención escualano, escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol

Tabla: 4. Resumen de los tiempos de retención de los compuestos analizados.

TIEMPOS DE RETENCIÓN	
COMPUESTO	TIEMPO (MINUTOS)
Escualano	22,81
Escualeno	26,18
Campesterol	31,39
Estigmasterol	31,65
Sitosterol	32,12

En la tabla 5 se presentan los datos de la preparación de las soluciones madre para cada uno de los componentes disueltos en cloroformo.

Tabla: 5. Datos de la preparación de las soluciones madre.

Reactivo	Escualano	Escualeno	Campesterol	Estigmasterol	Sitosterol
Pureza (%)	97,8	99	96	95,5	95,3
Marca	SIGMA				
Lote	LRAB9047	LRAB7475	1002772990	101978650	12730
Fecha preparación	31/12/2018	31/12/2018	31/12/2018	31/12/2018	31/12/2018
Peso mg	259,7	25,9	7,3	25,4	34,4
Corrección por pureza	254	25,64	7,008	24,26	32,78
Volumen Final (mL)	50	5	2	5	5
Concentración Final (ug/mL)	5080	8158	3504	4851	6557

Para realizar la curva de calibración se prepararon 7 puntos (Tabla 6) con concentraciones de 20, 40, 100, 200, 400, 700 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ para los patrones campesterol, estigmasterol, sitosterol y para escualeno se manejaron concentraciones de 100, 200, 400, 700, 1000, 1300 y 1600 $\mu\text{g/mL}$, se mezclan las soluciones en un balón de 10 mL agregando un mililitro de la solución de escualano de concentración 500 $\mu\text{g/mL}$, 1 mL de cloroformo para solubilizar los esteroides y se aforó con n-heptano. Las preparaciones se realizaron partiendo de las soluciones madre (Tabla 5).

Tabla: 6. Datos preparación de las curvas de los componentes

Numero de Punto	Escualeno	Solución de campesterol, estigmasterol y sitosterol
	V (μ L)	V (μ L)
1	100	20
2	200	40
3	400	100
4	700	200
5	1000	400
6	1300	700
7	1600	1000

La curva fue llevada a cabo de manera independiente por dos analistas denominados A y B, y los resultados obtenidos de los cálculos por cada uno se muestran en las Tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla: 7. Datos del analista (A), para las curvas de los componentes: escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol.

Analista – A							
Escualeno		Campesterol		Estigmasterol		Sitosterol	
Pendiente	1,078	Pendiente	1,028	Pendiente	0,847	Pendiente	0,921
Intercepto	-0,019	Intercepto	-0,010	Intercepto	-0,011	Intercepto	-0,023
R ²	0,997	R ²	0,9994	R ²	0,9993	R ²	0,998

Tabla: 8. Datos del analista (B), para las curvas de los componentes: escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol.

Analista – B							
Escualeno		Campesterol		Estigmasterol		Sitosterol	
Pendiente	1,129	Pendiente	1,100	Pendiente	0,8452	Pendiente	0,8386
Intercepto	-0,0065	Intercepto	-0,0042	Intercepto	-0,0033	Intercepto	-0,0083
R ²	0,9996	R ²	0,9996	R ²	0,9998	R ²	0,9995

Los resultados del modelo lineal evidenciaron la correlación existente entre la concentración y la media del área de los picos resultantes. La curva desarrollada por el analista A obtuvo un valor de R^2 promedio de 0,998, mientras que la desarrollada por el analista B presentó un valor de R^2 promedio de 1,000. Estos resultados indican linealidad adecuada en el rango de concentración trabajada. En las figuras 7 y 8 se presenta la curva de calibración de los patrones para cada uno de los patrones obtenidos por el analista A y B, respectivamente.

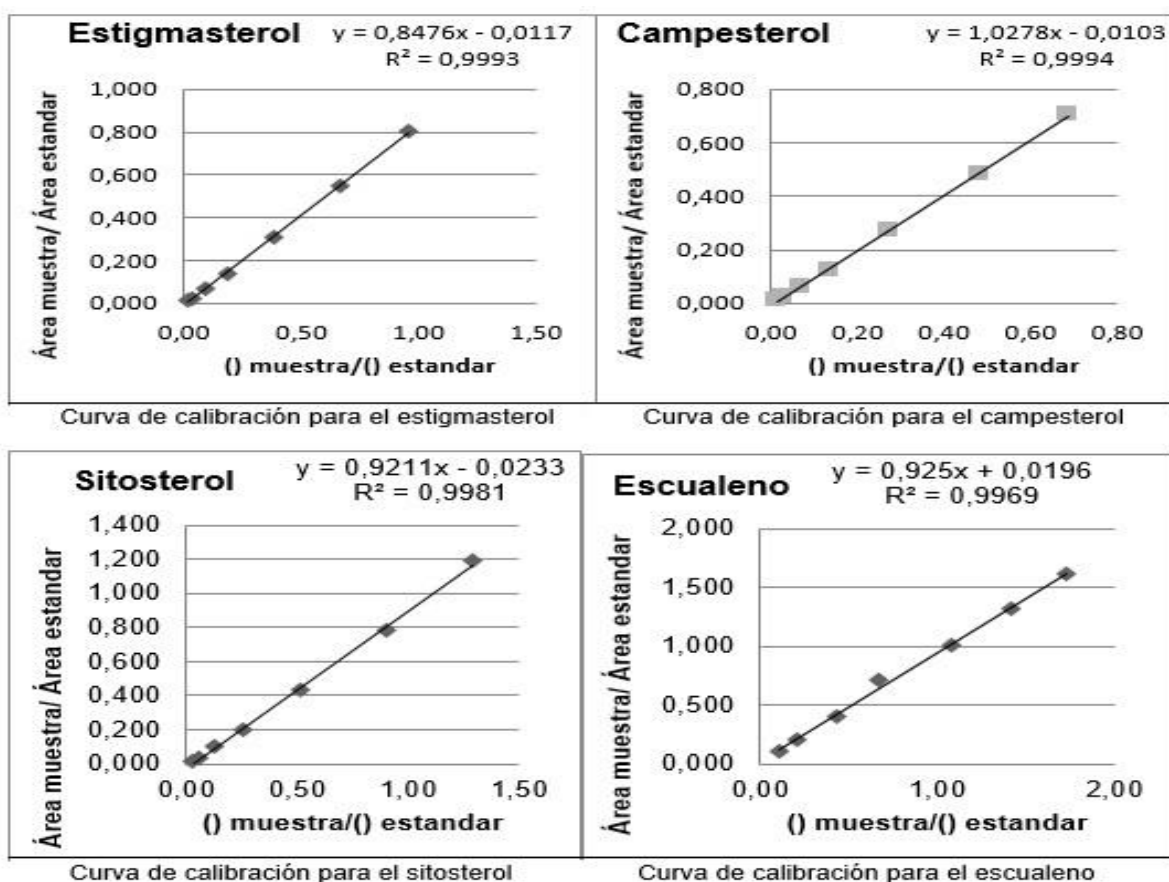


Figura: 7. Curvas de calibración de los patrones obtenidas por el analista A.

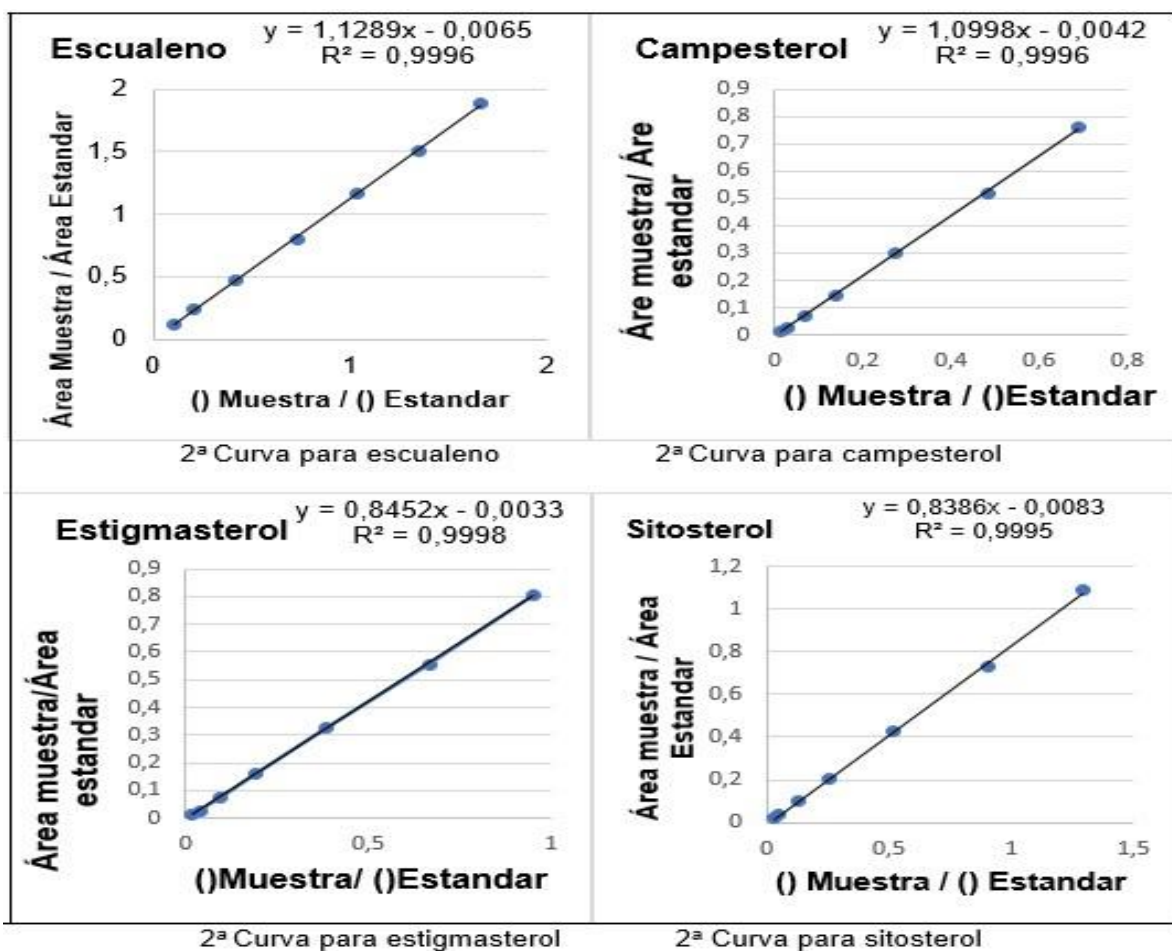


Figura: 8. Curvas de calibración de los patrones obtenidas por el analista B.

6.1 Resultados cuantificación de esteroides

Con base en la curva de calibración del método se obtiene el rango de áreas de cada compuesto (Tabla 9) con el fin de evidenciar los límites de la curva para la lectura de la muestra. El escualeno tiene las absorbancias más altas puesto que la curva se creó con concentraciones más elevadas en comparación con los otros componentes.

Tabla: 9. Rangos de áreas de la curva de calibración.

Área (nm)	uV	ESCUALENO (nm)	CAMPESTEROL (nm)	ESTIGMASTEROL (nm)	SITOSTEROL (nm)
Absorbancia Mínima		8519	923	1319	1538
Absorbancia Media		80810	31750	36420	53670
Absorbancia Máxima		153100	62570	71530	105800

Con base en la información obtenida se desarrollaron diferentes pruebas (tablas 10, 11 y 12), se realiza una comparación de diferentes concentraciones según la curva de calibración de cada componente en las muestras de aceite 283524, 313469 y 313519, donde se preparan dos corridas en un rango bajo, una corrida en rango medio y una corrida en rango alto. Para determinar el rango de área en la cual el equipo detecta los analitos de manera más eficiente y proporciona la mejor respuesta estadística.

Tabla: 10. Ensayo muestra de aceite número 283524.

Rango	Muestra	µg/mL	<i>Escualeno</i> %	Campesterol %	Estigmasterol %	Sitosterol %	Esteroles totales %
Ensayo A Bajo	283524	1605	3,96	0,55	1,3	1,41	3,26
		1500	4,04	0,56	1,34	1,49	3,39
Ensayo B Bajo		3210	3,64	0,42	1,08	1,05	2,56
		3000	3,59	0,41	1,08	1,06	2,55
Ensayo Medio		9370	3,41	0,29	0,95	0,77	2,02
		9370	3,46	0,31	0,97	0,78	2,06
Ensayo Alto		18740	3,41	0,28	0,96	0,73	1,97
		18740	3,42	0,29	0,95	0,73	1,97

Tabla: 11. Ensayo muestra de aceite número 313519.

Rango	Muestra	µg/mL	<i>Escualeno</i> %	Campesterol %	Estigmasterol %	Sitosterol %	Esteroles totales %
Ensayo A Bajo	313519	1228	8,06	1,51	3,93	3,91	9,35
		1200	8,17	1,49	3,95	3,95	9,4
Ensayo B Bajo		1736	6,91	0,98	3,13	2,59	6,7
		1336	6,97	1,09	3,28	2,81	7,18
Ensayo Medio		3768	6,85	0,88	3,07	2,99	6,94
		3884	7,09	0,87	3,18	3,01	7,06
Ensayo Alto		7536	6,88	0,84	3,09	2,93	6,86
		7768	7,09	0,87	3,18	3,01	7,05

Tabla: 12. Ensayo muestra de aceite número 313341.

Rango	Muestra	µg/mL	<i>Escualeno</i> %	Campesterol %	Estigmasterol %	Sitosterol %	Esteroles totales %
Ensayo A Bajo	313341	532	8,43	2,46	7,88	7,05	17,4
		574	8,49	2,58	8,07	7,02	17,67
Ensayo B Bajo		1772	7,1	2,04	7,21	5,54	14,79
		1912	6,9	1,27	7	5,36	13,63
Ensayo Medio		3960	6,3	1,86	6,73	4,92	13,5
		4120	6,61	1,92	6,9	5,02	13,83
Ensayo Alto		7920	6,53	1,84	7,07	4,97	13,89
		8240	6,47	1,77	6,97	4,94	13,68

Los resultados obtenidos en el ensayo evidencian que el rango de trabajo que proporciona la mejor respuesta corresponde al medio (Tabla 10, 11, 12), puesto que se obtienen datos repetibles y más congruentes que cuando se trabaja en el rango A de cada tabla, en el cual los datos son repetibles, pero generan un error significativo por la cercanía al límite inferior de la curva. Por este motivo fue necesario realizar un segundo

ensayo llamado B para trabajar en un rango bajo que no se encontrara al límite, arrojando unos datos repetibles. En estas condiciones se presenta el cromatograma de la Figura 9, en el cual se observan las 3 muestras de trabajo 313341, 283524 y 313519 usando **escualano** como patrón interno con una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ obteniendo una desviación estándar de 0.46 con promedio de 13,89% de esteroides totales para la muestra 313341, para la muestra 313519 una desviación estándar de 0,17 con promedio de 6,97% esteroides totales y para la muestra 283524 una desviación estándar de 0,29 con un promedio de 2,19% de esteroides. Eliminando los resultados que se obtienen en el ensayo A de las tablas 10, 11 y 12, ya que al trabajar con concentraciones que están entre un rango de absorbancia muy cercano al límite de áreas de la curva (tabla 9) los datos que se obtienen son incorrectos dando un resultado más alto que comparado con los otros ensayos.

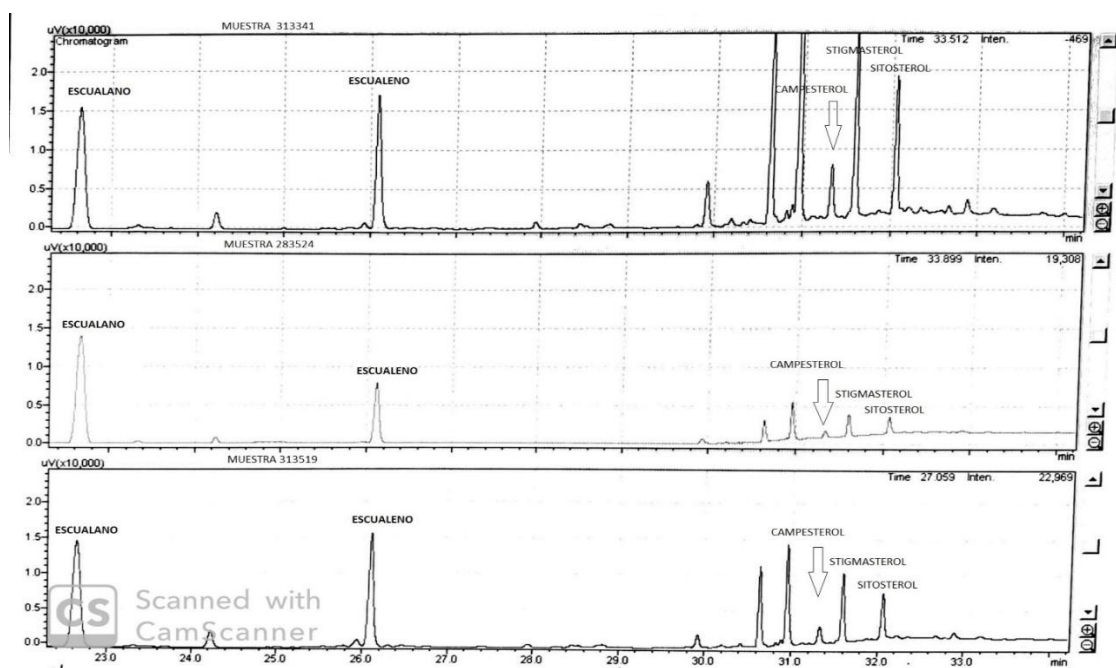


Figura: 9. Cromatograma de las muestras 313341, 283524 y 313519

Los resultados obtenidos para los parámetros de validación del método se presentan a continuación.

6.2 Exactitud

Los valores de error relativo para cada componente se pueden verificar en la tabla 13. Teóricamente la exactitud o sesgo es una medida de la proximidad existente entre la media de la tendencia central y el teórico o el valor esperado, μ . La exactitud se representa como un error relativo porcentual Er , mediante la siguiente ecuación.

(Rodríguez et al., 2014).

$$Er = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \times 100$$

Dónde:

\bar{X} : Valor promedio de las concentraciones de las 3 réplicas.

μ : Valor teórico o esperado.

6.3 Determinación de límite de detección, cuantificación y precisión.

El procedimiento que se realizó para determinar el límite inferior de detección fue basado en la concentración más baja en la cual los resultados son repetibles, se preparan patrones de concentración conocida cada uno 7 veces.

El límite se determinó analíticamente por medio del límite inferior tomando como base la concentración de cada patrón de las muestras, así (μg): para el estigmasterol:

61,43 el sitosterol: 60,11 el escualeno: 109,8 y para el campesterol: 59,90. Las muestras calculadas como se muestran en las (tabla 13), presentaron una concentración muy cercana a la concentración de cada patrón. Determinándose que esas son las concentraciones mínimas que se pueden trabajar para que los resultados analíticos sean confiables.

El límite de detección es la concentración mínima de un analito, en la matriz de una muestra que pueda detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo condiciones analíticas. (Acaro, Camacho, Castillo, Dávila, Gadway, Romero y Vega, 2017).

De igual forma se comprobó que al inyectar las muestras con concentraciones más bajas por debajo de las concentraciones determinadas, variaban y no cumplían con los datos estadísticos (tablas 10). En la tabla 10 podemos observar que los rangos bajos del ensayo A, los esteroides totales de las muestras dan un resultado de 3,26 %. En el ensayo B rango bajo con una mayor concentración el resultado de esteroides totales fue de 2,55%. En estas concentraciones bajas los resultados son dispersos y no dan buenos resultados. En cambio, en el ensayo medio el resultado fue 2,02 % y el ensayo alto el resultado es de 1,97 %. En los ensayos de rango medio y alto dan buenos resultados. Por tal motivo las curvas de calibración se trabajaron con concentraciones a rangos medios.

El límite de cuantificación (LC), es la mínima cantidad de analitos que puede ser cuantificada con una exactitud aceptable. Se desarrolló calculando la cantidad promedio de analito, más 10 veces la desviación estándar. (Salkind, 1999).

Se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$LC = \bar{X}_{n=7} + 10 * S_{n-1}$$

Dónde:

$\bar{X}_{n=7}$ = Concentración media.

S_{n-1} = Desviación estándar de las concentraciones.

Tabla: 13. Estadísticas de 7 puntos por patrón de escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol para determinar límite de detección, límite cuantificación, precisión y exactitud.

Nombre	Desviación estándar	Promedio μg	Coefficiente de variación (%)	Error relativo general	LID μg	LC μg
Escualeno	2,7	115,5	2,3	-4,80	109,8	138,5
Campesterol	0,2	58,6	0,4	2,11	59,90	60,6
Estigmasterol	0,6	62,2	0,9	1,22	61,43	68,2
Sitosterol	0,5	66,2	0,7	-9,57	60,11	71,2

6.4 Coeficiente de correlación lineal

Los coeficientes de correlación lineal para cada curva de calibración de los componentes estudiados; muestran una linealidad adecuada ya que los valores r son muy cercanos a la unidad, así: en la tabla 14, para el estigmasterol un valor de 0,999 para el campesterol de 0,9994 para el sitosterol 0,9981 y el escualeno 0,9969. Para la confirmación de la linealidad del método se realizó la prueba estadística test de student:

- Distribución del t de student

Para desarrollar el indicador se plantean dos hipótesis y se someten a prueba, así:

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

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

Para el desarrollo se calcula t_r con $n - 2$ grados de libertad para niveles de confianza del 95% y 99% siendo n el número de niveles de concentración analizados y se procede a comparar con el valor t_{critico} que comprende al t tabulado.

Se considera un nivel alfa de: 0.05 para proyectos de investigación; 0.01 para aseguramientos de calidad. (Martínez, 2017)

Para el cálculo de t_r se utilizó la siguiente formula:

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

En un nivel de confianza del 99% (probabilidad $p = 0.01$) $n=7-2= 5$ grados de libertad, se tiene $t_{\text{critico}} = 4.0320$. En el anexo 3, imagen 10 se presentan los valores de t

para los diferentes niveles de probabilidad, lo cual nos permite comprobar nuestra prueba de linealidad de un 99%.

Por lo que si $t > t_c$ se rechaza la hipótesis nula

Tabla: 14. Resultados estadísticos obtenidos para el test de linealidad. Para el analista (A).

Compuesto	R	R ²	t	t _{critico}	H ₀	Correlación lineal
Estigmasterol	0,999	0,9980	49.96	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal
Campesterol	0,9994	0,9988	64.52	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal
Sitosterol	0,9981	0,9962	36.22	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal
Escualeno	0,9969	0,9938	28.33	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal

Cálculo de t_r del estigmasterol, así:

$$t = \frac{0,999 * \sqrt{7-2}}{\sqrt{1-0,999^2}} = \frac{0,999 * \sqrt{5}}{\sqrt{1,999 \times 10^{-3}}} = \frac{0,999 * 2,236067977}{0,044710177} = \frac{2,233831909}{0,044710177}$$

$$t = 49.96$$

El estigmasterol está en un nivel de confianza del 99%, dentro de la probabilidad $p = 0.01$, con un $t = 49,96$ mayor que el $t_{\text{crítico}} = 4.0320$, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Cálculo de t_r del Campesterol, así:

$$t = \frac{0,9994 * \sqrt{7 - 2}}{\sqrt{1 - 0,9994^2}} = \frac{0,9994 * \sqrt{5}}{\sqrt{1.19964 \times 10^{-3}}} = \frac{0,9994 * 2,236067977}{0.034635819} =$$

$$= \frac{2.234726336}{0.034635819}$$

$$t = 64.52$$

Como se puede observar basándose en la fórmula anterior es posible calcular el t_r para los demás componentes.

Tabla: 15. Resultados estadísticos obtenidos para el test de linealidad. Para el analista (B).

Compuesto	R	R ²	t	t _{crítico}	H ₀	Correlación lineal
Estigmasterol	0,9998	0.9996	111.8	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal
Campesterol	0,9996	0.9992	79.03	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal
Sitosterol	0,9995	0.9990	70.68	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal
Escualeno	0,9996	0.9992	79.03	4.03	Rechazada	Existe correlación lineal

Como se muestra y comprueba en las tablas 14 y 15, la hipótesis nula es falsa, ya que los valores de t son mayores al valor de $t_{\text{crítico}}$, para los 5 grados de libertad en

un nivel de confianza del 99%. La hipótesis alternativa es verdadera. Por tanto, podemos decir que hay una relación significativa entre las variables. En general las curvas de calibración correlacionan en concentración y respuesta del equipo utilizado de forma lineal.

6.5 Rango de trabajo

Se determinó por medio de una serie de resultados repetidos, que corresponden a la diferencia entre el valor más alto y el valor más bajo de la serie. En la tabla 16 se registraron los porcentajes de coeficientes de variación y desviación estándar de la muestra 283524 con la cual se pasan triplicados para determinar el rango de trabajo en concentraciones y absorbancias que se encuentran en el rango medio de la curva de calibración. El coeficiente de variación es inferior al 5%, por lo que se considera dentro del rango de trabajo experimental.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. (AEFI, 2001).

Tabla: 16. Triplicado de la muestra 283524

	Rango	Medio Triplicado			
Muestra 283524	Escualeno	Campesterol	Stigmasterol	Sitosterol	Esteroles totales
Analista 1	3,41	0,29	0,95	0,77	2,02
	3,46	0,31	0,97	0,78	2,06
	3,41	0,28	0,96	0,73	1,97
Desviación estándar	0,03	0,02	0,01	0,03	0,05

Promedio	3,43	0,29	0,96	0,76	2,02
CV%	0,84	5,21	1,04	3,48	2,24

6.6 Precisión

Dado que la precisión está comprendida por las variables de las mediciones, este se calculó en términos del porcentaje de desviación estándar relativa Sr , por medio de los datos obtenidos:

$$Sr = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Dónde:

S: desviación estándar

\bar{x} : Valor promedio de las concentraciones de las 7 replicas

Para la determinación se realizó en función de:

6.6.1 Repetibilidad

Se trabajó por medio de (7) siete réplicas de cada estándar en distintas concentraciones, calculándose: promedio \bar{x} , desviación estándar y coeficiente de variación.

6.7 Sensibilidad

La sensibilidad del método la podemos evidencia por medio de la pendiente de la curva de calibración para cada uno de los componentes: estigmasterol, campesterol, sitosterol y escualeno (ver figuras 7 y 8), cuanto mayor es la pendiente el método es más sensible. (Rodríguez, Pellerano, Romero, Acevedo y Vázquez, 2012).

La sensibilidad del método mide su capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Para dos métodos que tengan igual precisión, el que tenga mayor pendiente será el más sensible (Dosal y Villanueva, 2008).

6.8 Linealidad

A partir de los patrones se elaboró la curva de calibración de cada uno de los componentes. Y se obtuvo la ecuación de la recta $y = m x + b$. Realizándose el cálculo del coeficiente de correlación de cada uno de ellos.

Se calculó:

La pendiente (m)

La ordenada al origen (b)

El coeficiente de determinación (r^2)

Finalmente, los resultados de los parámetros de validación se resumen en las siguientes tablas:

Tabla: 17. Resumen condiciones del método de validación

EQUIPO	cromatografía de gases marca Shimadzu, modelo GC2010 Plus
SISTEMA DE INYECCIÓN	On-Colum-Split/Splitless
COLUMNA	DB5 19091J-413 (Agilent technologies 30 m x 0,320 mm x 0,25 μ m)
FASE MÓVIL O	

GAS DE ARRASTRE	Helio					
DETECTOR FID	temperatura		relación de aire/H ₂		flujo de helio	
	325 °C		40/400 o 1/10		40mL/min	
MÉTODO SPLIT	presión	flujo total	flujo en columna	velocidad lineal	flujo de purga	Split ratio
	91,0 Kpa	129,4 mL/min	6,02 mL/min	90,5 cm/sec	3,0 mL/min	20,0
GRADIENTE DE TEMPERATURA	Temperatura			Tiempo		
	50,0 °C			1 min		
	220 °C			0,0 min		
	230,0 °C			0,0 min		
	280,0 °C			0,0 min		
	350,0 °C			20 min		

Tabla: 18. Resumen de los parámetros de validación.

COMPUESTOS				
PARÁMETRO DE VALIDACIÓN	ESCUALENO	CAMPESTEROL	SITOSTEROL	ESTIGMASTEROL
Límite de detección (μg)	109,8	59,90	60,11	61,43
Límite de cuantificación (μg)	138,5	60,6	71,2	68,2
Error relativo general	-4,80	2,11	-9,57	1,22
Rango de trabajo %	2,3	0,4	0,7	0,9
Linealidad	0,9969	0,9994	0,9981	0,999
Precisión	2,3	0,4	0,7	0,9

Los valores obtenidos están dentro del rango por lo que se puede establecer que se obtuvo un método con sensibilidad y precisión en condiciones de repetibilidad aceptable.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se validó un método de cuantificación de escualeno, campesterol, sitosterol y estigmasterol en muestras concentradas de aceite de palma empleando la técnica CG-FID. Los resultados mostraron coeficientes de correlación cercanos a la unidad, valores de sensibilidad altos, precisión con valores inferiores al 5% y presentado una exactitud con porcentaje de error relativo general menores al 5%. Indicando que la precisión y repetibilidad del método investigado tiene validez en la técnica para el respectivo análisis de componentes menores en aceites.

El límite inferior de detección de los componentes calculados, presentaron una concentración muy cercana a la concentración de cada patrón (μg), así: estigmasterol 61,43, sitosterol 60,11, escualeno 109,78 y campesterol 59,90. Por lo que se comprueba que esas son las concentraciones que se pueden trabajar para que los resultados analíticos sean confiables.

La cuantificación de los componentes menores por la técnica de cromatografía de gases con patrón interno y sin derivatización representa una precisión aceptable, económicamente viable, buena calidad de los resultados analíticos y con mínima generación de residuos tóxicos.

Las curvas de calibración de cada componente (figuras 7 y 8) con valores estadísticos adecuados y con coeficientes de correlación (R^2) cercano a la unidad,

indica que el método detecta los mínimos cambio de concentración del analito en las muestras.

Se evaluaron tres muestras de trabajo con concentración de fitonutrientes en donde la 313341 se obtuvo una desviación estándar de 0,46 con un promedio de 13,89 % de concentración de esteroides. Para la muestra 313519 se obtuvo una desviación estándar de 0,17 con promedio de 6.97 % de concentración de esteroides y para la muestra 283524 una desviación estándar de 0,29 con un promedio de 2,19 % de concentración de esteroides. Resultados que son satisfactorios en la evaluación del contenido de los componentes en muestra de aceite de palma.

Se asegura la confiabilidad de los resultados mediante los parámetros de validación como límite de detección, límite de cuantificación, Linealidad, exactitud, rango de trabajo, precisión y repetibilidad en los analitos escualeno, campesterol, estigmasterol y sitosterol en una muestra de aceite de palma.

El escualeno como patrón interno cumplió con los requisitos pertinentes para la determinación adecuada.

Se logró diseñar la metodología analítica con resultados aceptables. Sin embargo hubo criterios de evaluación como robustez que no se tuvieron en cuenta por disponibilidad de tiempo no se realizó.

Se logró desarrollar el método con patrón interno y sin derivatización representa, económicamente viable y amable con el medio ambiente.

Se logra garantizar los resultados trabajando en Rango medio.

Se le garantiza a la empresa Bio D que el método de cuantificación de fitonutrientes puede ser empleado para sus necesidades con resultados confiables.

Para la implementación del método se recomienda evaluar el parámetro de robustez, el cual no fue evaluado durante el desarrollo de la validación.

Se recomienda evaluar este método siguiendo la metodología de interlaboratorios para ampliar y asegurar los resultados obtenidos.

Es recomendado evaluar un mayor número de muestras de diferentes orígenes y procedencia para conocer el comportamiento del método.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acaro, J., Camacho, A., Castillo, A., Dávila, K., Gadway, K., Romero, H. y Vega, C. (2017). Confiabilidad de un método para la determinación de CO₂ por cromatografía de gases. Vol. 3(1). Universidad Técnica de Machala.
- AEFI. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001). Validación de métodos analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad.
- Agropalma (2013) Aceite crudo de palma CPO (Crude Palm Oil). Recuperado de, <http://agropalmahn.com/wp-content/uploads/2013/12/Aceite-Crudo-CPO.pdf>
- Arias, A., Gil, D., y Arrubla, J. (2013). Análisis de fitoesteroles en la semilla del estropajo, *luffa cylindrica* por cromatografía de gases capilar. Vol. 18(3), 535-541. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Barqueros, Q. M. (2006). Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases. Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias. San Jose de Costa Rica, recuperado de, https://books.google.com.co/books?id=g3o_PUTmr3wC&pg=PA31&lpg=PA31&dq=detector+de+ionizaci%C3%B3n+de+lama+caracter%C3%ADsticas&source=bl&ots=Tm2O-TM2bO&sig=ACfU3U0YhxTyRTSBuA2YJa-t4Q5vyord8w&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjgsY3luubmAhVNpFkKHdezCx84FBD

oATAEgQIChAB#v=onpage&q=detector%20de%20ionizaci%C3%B3n%20de%20llama%20caracter%C3%ADsticas&f=false

Barrera, R. S. y Arrubla, J. P. (2017). Análisis de fitoesteroles en la semilla de persea americana miller (Var. Lorena) por cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. Revista Facultad de Ciencias Básicas. Vol. 13 (1), 36-41.

Betancur, L., Ocampo, D., Ocampo, R. y Ríos, L. (2008). Curso práctico de química orgánica enfocado a biología y alimentos. Universidad de Caldas. Colombia. Recuperado de, https://books.google.com.co/books?id=qmFQ3LwymmMC&pg=PA176&lpg=PA176&dq=piridina+riesgos&source=bl&ots=wYn_HK7PCd&sig=ACfU3U3dlgcMTj0h6nRJAqxJ1b87nTo6xg&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj536jytOnmAhUwo1kKHRYMDCI4ChDoATAHegQIChAB#v=onpage&q=piridina%20riesgos&f=false

Cardona, Y., Chaparro, A., Calderón, L., Peláez, M. y García, C. (2011). Estandarización de un método analítico para extracción y cuantificación de cipermetrina en pastos. Universidad de Pamplona, Norte de Santander. Colombia. Recuperado de, <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/26090/28751> Cca-pro-020 verificación de métodos de ensayo. Recuperado el 1 abril de 2018. <https://biod-sofexpert/softexpert/workspace?page=execution,88,62>.

- Cenipalma (2013) Guía sobre el aceite de palma y sus aplicaciones. Bogotá, D.C., Colombia. Recuperado de, <http://www.palmadeaceite.org/sites/default/files/Gu%C3%ADa%20aceite%20de%20palma%20y%20aplicaciones.pdf>
- Christie, W.W. (2003) Análisis de lípidos: Aislamiento, separación, identificación y análisis estructural de lípidos. Bridgewater, Reino Unido, the Oily Press
- Coy, G. (2006). Estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. República de Colombia, recuperado de, http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion_metodos_analitos.pdf/934bd941-dd47-4501-8507-d2721ef4f316
- Delgado, W., Echeverry, L. F. y Suárez, S. R. (2004) Caracterización fisicoquímica del aceite de palma crudo proveniente de diferentes materiales genéticos y de dos zonas geográficas de Colombia. Vol. 25 No. Especial, Tomo II. Recuperado de, <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1068/1068file:///D:/1068-Texto-1068-1-10-20120719.pdf>
- Díaz, N. (2006). Desarrollo, validación y aplicación de métodos cromatográficos para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en fuentes de abastecimiento de agua potable de la ciudad de Monterrey. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ciudad de Monterrey. Recuperado de, <http://eprints.uanl.mx/5873/1/1080128444.PDF>

Díaz., C. y Ferreira, L. (2011). Química Analítica: materiales docentes gGrado de Ingeniería Química 2º curso. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Dosal, M. A. y Villanueva, M. (2008). Curvas de calibración en los métodos analíticos. Recuperado de, http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf

Duran, A. S., Torres, G. J. y Sanhueza, C. J. (2015). Aceites vegetales de uso frecuente en Sudamérica: características y propiedades. Universidad de Chile, Chile. Disponible en, <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134278/Aceites-vegetales-de-uso-frecuente-en-Sudamerica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fernández, S. y García. M. (2012). Cuantificación de compuestos por cromatografía: método del patrón interno. Universidad politécnica de valencia. Disponible en, <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16356/M%E9todo%20Patr%F3n%20Interno.pdf?sequence=2>

Ferrero, C. M. (2017). La explotación de las vitaminas y fitonutrientes de la palma. PALMVIT. Recuperado el 02 de agosto de 2017 de <http://www.palmvit.com/953/>

Garzón, G. y Popayán, M. (2007). Estandarización de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de carbamazepina en tabletas. Recuperado de, <https://red.uao.edu.co/bitstream/10614/232/1/T0003214.pdf>

- Giraldo, G. I. (1999). Validación de métodos analíticos de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia. Manizales. Recuperado el 20 de agosto de 2018 de, <http://bdigital.unal.edu.co/51131/1/validaciondemetodosanaliticosdelaboratorio.pdf>
- Harris. D., C. (2007). Análisis químico cuantitativo. Sexta Edición. Barcelona España. Recuperado de, https://books.google.com.co/books?id=H-_8vZYdL70C&printsec=frontcover&vq=patr%C3%B3n+interno&hl=es&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=patr%C3%B3n%20interno&f=false
- Jalocha. J. y Gómez, C. C. (2002). Análisis de polialcoholes, ácidos carboxílicos y azúcares por cromatografía de gases: una revisión. Disponible en, <https://www.secyta.es/sites/default/files/docs/journals/2002/VOL23NUM1%202002.pdf>
- Kaur, N., Chaudhary, J., Jain, A. y Kishore, L. (2011). Stigmasterol: A Comprehensive Review. Revista Internacional de Ciencia Farmaceutica e Investigación, Vol 2, (9), 2259-2265. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(9\).2259-65](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(9).2259-65)
- Martinez, J. (2017). Validación de un método químico analítico de HPLC en R. Fundación universitaria los libertadores. Bogotá D.C.
- Meco, L., Pascual, V. y Alberich, R. (2016) La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica. Sociedad Española de Arteriosclerosis. Recuperado el 02 de agosto de 2017 de <http://www.elsevier.es/es-revista-clinica->

e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-la-utilizacion-los-esteroles-vegetales-S0214916816300274

Miller, N. J. y Miller, J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4^a. Edición, Ed. Pearson, Madrid, pp 112-155

Normas técnicas colombiana NTC-ISO/IEC 17025 (2017005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá, D.C. Bogotá, D.C. Recuperado el 21/Mar/2018 de, https://www.invima.gov.co/images/pdf/red-nal-laboratorios/resoluciones/NTC-ISO-IEC_17025-2005.pdf

Oficina de la Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2010). La validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Viena. Recuperado de, https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf

Oliver. A., Segura. C., Bonet. M., Oliver. P., Serra. F., Rodríguez, A. y Ribot, J. (2005). El libro blanco de los esteroides vegetales 2^a Edición. Universidad de las Islas Baleares. Página 2. Recuperado el 01 de agosto de 2018 de, http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/libro_blanco_esteroides_vegetales.pdf

Olquín, L. y Rodríguez, H. (2004). Métodos en biotecnología. Universidad nacional autónoma de México. Recuperado de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf

Pássaro, C., Rivera, C., Román, M., Cardona, L., Muñoz, L., Gómez, D., Quiceno, J. y Rojas, L. (2016). Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. Servicio nacional de aprendizaje – SENA. Rionegro – Antioquia. Recuperado de, https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/4694/1/guia_cromatografia.pdf

Quirantes, R., Domínguez, J., Segura, A. y Fernández, A. (2015). Técnica de análisis del aceite de oliva, Capítulo 9. Universidad de Granada. Página 253. Recuperado el 01 de agosto de 2018 de, https://www.researchgate.net/publication/268175164_Tecnicas_de_analisis_del_aceite_de_oliva

Rincón, S. M. y Martínez, D. M. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. Vol. 30 No.2. Recuperado de, <file:///D:/1432-Texto-1432-1-10-20120719.pdf>

Rodríguez, J., Amaya, C., Caballero, P., Alanís, M., Aguilera, C., Báez, J., Moreno, S. y Núñez, A. (2014). Optimización de un método para determinación de fitoesteroles y escualeno en ácidos grasos destilados usando la metodología de superficie de respuesta y su validación. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(4), 1-10. Recuperado en 06 de enero de 2020, de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400005&lng=es&tlng=es.

Rodríguez, S. C., Pellerano, R. G., Romero, C. H., Acevedo, H. A. y Vázquez, F. A. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Revista Tumbaga*.

Ronco, A. L. (2009). Usos potenciales del escualano – de la prevención a la terapéutica. Instituto de radiología y centro de lucha contra el cáncer, facultad de medicina, IUCLAEH, Maldonado, Uruguay. Recuperado de, http://www.tendenciasenmedicina.com/Imagenes/imagenes34/art_15.pdf

Salkind, N, J. (1999). Método de investigación, tercera edición. Pearson Prentice Hall. Pág. 171,172, 173. México.

Skoog, D. A., Holler, F. J. y Crouch, S. R. (2008). Principios de análisis instrumental, sexta edición. Cengage Learning. México. Recuperado de, <https://hdquimicaeiqttotalh.files.wordpress.com/2018/10/principios-de-analisis-instrumental-skoog-6a-ed.pdf>

Valbuena, V. (2014). Desarrollo de una metodología para la determinación y análisis de parafinas a alta presión (tesis doctoral). Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias, Caracas, Venezuela.

Valenzuela, A. y Ronco, A. (2004). FITOESTEROLES Y FITOESTANOLES: ALIADOS NATURALES PARA LA PROTECCION DE LA SALUD

CARDIOVASCULAR. *Revista chilena de nutrición*, 31(Supl. 1), 161-169. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182004031100003>

Woob, B. J. y Beattle, T. E. (1982), Palmas “Procesamiento y mercado del aceite de palma africana” Volumen 3 numero 2. Recuperado de, <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/issue/view/4>

Yuan, C., Zhang, X., Long, X., Jin, J. y Jin, R. (2019). Efecto de la auto-microemulsión de β -sitosterol y el éster de β -sitosterol con ácido linoleico sobre la disminución de lípidos en ratones hiperlipidémicos. *Lipids Health Dis* 18, 157. Recuperado de, <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-019-1096-2>

10. ANEXOS

ANEXO 1. Cálculo del coeficiente de correlación lineal para la validación del estigmasterol

En todos los niveles de concentración se determinó la media, desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar relativa. Con el respectivo proceso de este ejemplo podemos comprobar la correlación lineal de cada componente en estudio.

Valores numéricos de (X) y (Y), para validar la curva de calibración del estigmasterol (analista A).

n	Xi	Yi	Xi. Yi	X ²	Y ²	(Xi - X̄)
1	0,019	0,016	0,000304	0,000361	0,000256	-0,317
2	0,038	0,024	0,000912	0,001444	0,000576	-0,298
3	0,096	0,068	0,006528	0,009216	0,004624	-0,24
4	0,191	0,139	0,026549	0,036481	0,019321	-0,145
5	0,382	0,308	0,117656	0,145924	0,094864	0,046
6	0,669	0,549	0,367281	0,447561	0,301401	0,333
7	0,955	0,806	0,76973	0,912025	0,649636	0,619
	2,35	1,91	1,28896	1,553012	1,070678	-0,002

n	(Yi - Ȳ)	(Xi - X̄) ²	(Yi - Ȳ) ²	(Xi - X̄)(Yi - Ȳ)
1	-0,257	0,100489	0,066049	0,081469
2	-0,249	0,088804	0,062001	0,074202
3	-0,205	0,0576	0,042025	0,0492
4	-0,134	0,021025	0,017956	0,01943
5	0,035	0,002116	0,001225	0,00161
6	0,276	0,110889	0,076176	0,091908
7	0,533	0,383161	0,284089	0,329927
	-0,001	0,764084	0,549521	0,647746

Cálculo de la pendiente (m), estigmasterol.

Formula: $y = mx + b$

$$m = \frac{n (\sum Xi Yi) - (\sum Xi)(\sum Yi)}{n (\sum Xi^2) - (\sum Xi)^2}$$

$$m = \frac{7(1.28896) - (2.35)(1.91)}{7(1.553012) - (2.35)^2}$$

$$m = \frac{4.53422}{5.3485884} = 0.847741434$$

Pendiente **m** = 0.847741434

Cálculo del punto de intersección o intercepto

$$b = \frac{(\sum Yi) - m(\sum Xi)}{n}$$

$$b = \frac{(1.91) - (0.847741434)(2.35)}{7} = \frac{-0.082192369}{7} = -0.011741767$$

Punto intercepto **b** = -0.011741767

Cálculo del coeficiente de correlación lineal

Media aritmética de \bar{X} y \bar{Y}

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

\bar{X} : Media aritmética

X_i : Valor medio en el ensayo

n : Numero de medidas realizadas

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} \quad \bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{2.35}{7} = 0.335714285 = 0,336$$

$$\bar{Y} = \frac{1.91}{7} = 0.272857142 = 0,273$$

Desviación estándar de X y Y

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

$$SD^2 x = \frac{(0,019 - 0,336)^2 + (0,038 - 0,336)^2 + (0,096 - 0,336)^2 + (0,191 - 0,336)^2 + (0,382 - 0,336)^2 + (0,669 - 0,336)^2 + (0,955)^2}{7 - 1} =$$

$$SD^2 x = \frac{(0,100489) + (0,088804) + (0,0576) + (0,331776) + (0,002116) + (0,110889) + (0,383161)}{7 - 1} = \frac{0,764084}{6} =$$

$$SD^2 x = 0.127347333$$

$$SD x = \sqrt{0.127347333} = 0,356858$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_I^N (x_i \bar{Y})^2}{n - 1}}$$

$$SD^2y = \frac{(0,016 - 0,273)^2 + (0,024 - 0,273)^2 + (0,068 - 0,273)^2 + (0,139 - 0,273)^2 + (0,308 - 0,273)^2 + (0,549 - 0,273)^2 + (0,806 - 0,273)^2}{7 - 1} =$$

$$SD^2 = \frac{(0,066049) + (0,062001) + (0,042025) + (0,017956) + (0,001225) + (0,076176) + (0,284089)}{7 - 1} = \frac{0,549521}{6} = 0,091586833$$

$$SD^2y = 0,091586833$$

$$SDy = \sqrt{0,091586833} = 0,302633$$

Desviación estándar en X = 0,356858

Desviación estándar en Y = 0,302633

Cálculo de coeficiente de correlación

Formula:

$$r = \frac{\sum(Xi - \bar{X})(Yi - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(Xi - \bar{X})^2} \sqrt{\sum(Yi - \bar{Y})^2}}$$

$$r = \frac{0,647746}{\sqrt{0,764084} \sqrt{0,549521}}$$

$$\frac{0,647746}{(0,874118985)(0,741296836)} = \frac{0,647746}{0,647981637} = 0,9996$$

Próximo a 1 por lo que se comprueba que la curva de calibración es muy exacta.

ANEXO 2. Cálculo del coeficiente de correlación lineal para la validación del escualeno.

Con el respectivo proceso de este ejemplo podemos comprobar la correlación lineal de cada componente en estudio.

Valores numéricos de (X) y (Y), para validar la curva de calibración del escualeno (analista B).

n	Xi	Yi	Xi. Yi	$(Xi - \bar{X})$
1	0,104067	0,11798	0,012278	-0,683933
2	0,208134	0,233832	0,048668	-0,579866
3	0,416268	0,468298	0,194937	-0,371732
4	0,728469	0,793185	0,577811	-0,059531
5	1,040669	1,169451	1,217011	0,252669
6	1,35287	1,507402	2,039319	0,56487
7	1,665071	1,890939	3,148548	0,877071
	5.515548	6.181087	7,238572	-0,000452

n	$(Yi - \bar{Y})$	$(Xi - \bar{X})^2$	$(Yi - \bar{Y})^2$	$(Xi - \bar{X})(Yi - \bar{Y})$
1	-0,76502	0,467764348489	0,5852556004	0,52322242366
2	-0,649168	0,336244577956	0,421419092224	0,376430451488
3	-0,414702	0,138184679824	0,171977748804	0,154158003864
4	-0,089815	0,003543939961	0,008066734225	0,005346776765
5	0,286451	0,063841623561	0,082054175401	0,072377287719
6	0,624402	0,3190781169	0,389877857604	0,35270595774
7	1,007939	0,769253539041	1,015941027721	0,884034066669
	0,000087	2,09791083	2,67459224	2,368274968

Ecuación Lineal

Formula: $y = mx + b$

$$m = \frac{7 (\sum Xi Yi) - (\sum Xi)(\sum Yi)}{n (\sum Xi^2) - (\sum Xi)^2}$$

$$m = \frac{7(7,238572) - (5.515548)(6.181087)}{7(6,443806) - (5.515548)^2}$$

$$m = \frac{16.57792196}{14.68537226} = 1.128873117$$

Pendiente **m** = 1,1289

Cálculo del punto de intersección o intercepto

$$b = \frac{(\sum Yi) - m(\sum Xi)}{n}$$

$$b = \frac{(6.181087) - (1.1289)(5.515548)}{7} = \frac{-0.045415137}{7} =$$

$$b = -0,00648787671428571428571428571429$$

Punto intercepto (**b**) = - 0,0065

Cálculo del coeficiente de correlación lineal

Media aritmética de \bar{X} y \bar{Y}

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

\bar{X} : Media aritmética

X_i : Valor medio en el ensayo

n : Numero de medidas realizadas

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} \quad \bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{5.515548}{7} = 0,787935428$$

$$\bar{X} = \mathbf{0,788}$$

$$\bar{Y} = \frac{6.181087}{7} = 0,883012428$$

$$\bar{Y} = \mathbf{0,883}$$

Desviación estándar de X y Y

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

$$SD^2 x = \frac{(0,104067 - 0,788)^2 + (0,208134 - 0,788)^2 + (0,416268 - 0,788)^2 + (0,728469 - 0,788)^2 + (1,040669 - 0,788)^2 + (1,35287 - 0,788)^2 + (1,665071)^2}{7 - 1} =$$

$$SD^2 x = \frac{(0,467764348489) + (0,336244577956) + (0,138184679824) + (0,003543939961) + (0,063841623561) + (0,3190781169) + (0,769253539041)}{7 - 1} = \frac{2,09791083}{6} = 0,349651805$$

$$SD^2 x = 0,349651805$$

$$SD x = \sqrt{0,349651805} = \mathbf{0,591313626}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i^N (x_i - \bar{Y})^2}{n - 1}}$$

$$SD^2 y = \frac{(0,11798 - 0,883)^2 + (0,233832 - 0,883)^2 + (0,468298 - 0,883)^2 + (0,793185 - 0,883)^2 + (0,286451 - 0,883)^2 + (0,624402 - 0,883)^2 + (1,007939 - 0,883)^2}{7 - 1} =$$

$$SD^2 y = \frac{(0,5852556004) + (0,421419092224) + (0,171977748804) + (0,008066734225) + (0,082054175401) + (0,389877857604) + (1,015941027721)}{7 - 1} = \frac{2,67459224}{6} = 0,445765373$$

$$SD^2 y = 0,445765373$$

$$SD y = \sqrt{0,445765373} = 0,667656628$$

Desviación estándar en X = **0,591313626**

Desviación estándar en Y = **0,667656628**

Cálculo del coeficiente de correlación

Formula:

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2} \sqrt{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

$$r = \frac{2,368274968}{\sqrt{2,09791083} \sqrt{2,67459224}}$$

$$\frac{2,368274968}{(1,448416663)(1,635418063)} = \frac{2,368274968}{2,368766773} = 0,999$$

Próximo a **1** por lo que se comprueba que la curva de calibración es muy exacta.

ANEXO 3. Valores de t para niveles de probabilidad.

Grados de libertad	80%	90%	95%	99%	99.9%
1	3.08	6.31	12.7	63.7	637
2	1.89	2.92	4.30	9.92	31.6
3	1.64	2.35	3.18	5.84	12.9
4	1.53	2.13	2.78	4.60	8.61
5	1.48	2.02	2.57	4.03	6.87
6	1.44	1.94	2.45	3.71	5.96
7	1.42	1.90	2.36	3.50	5.41
8	1.40	1.86	2.31	3.36	5.04
9	1.38	1.83	2.26	3.25	4.78
10	1.37	1.81	2.23	3.17	4.59
15	1.34	1.75	2.13	2.95	4.07
20	1.32	1.73	2.09	2.84	3.85
40	1.30	1.68	2.02	2.70	3.55
60	1.30	1.67	2.00	2.62	3.46
∞	1.28	1.64	1.96	2.58	3.29

Figura: A1. Principios de análisis instrumental. Recuperado de, Skoog, D.A., Holler F.J y Crouch, S. R. (2008).

ANEXO 4. Datos estadísticos de los componentes para determinar error relativo general, desviación estándar, promedio y porcentaje de variación.

Tabla A1. Datos estadísticos del estigmasterol para determinar error relativo general, desviación estándar, promedio y porcentaje de variación.

Estigmasterol				Dilución					
uL	w (mg)	Volumen SLN	[mg/mL] SLN Madre	Vol. Inicial	Vol. Final	[]	Dilución Final	ug muestra	ug Muestra calculadas
120	25,8805	5	5118,8	0,2	2	511,88	10	61,4256	61,56
120	25,8805	5	5118,8	0,2	2	511,88	10	61,4256	62,27
120	25,8805	5	5118,8	0,2	2	511,88	10	61,4256	62,69
								Error relativo general	-1,22
								Desviación estándar	0,6
								Promedio	62,2
								CV%	0,9
								máximo	62,69
								mínimo	61,56
								Gmax	0,526
								Gmin	0,100

Tabla A2. Datos estadísticos del sitosterol para determinar error relativo general, desviación estándar, promedio y porcentaje de variación.

Sitosterol				Dilución					
uL	w (mg)	Volumen SLN	[mg/mL] SLN Madre	Vol. Inicial	Vol. Final	[]	Dilución Final		ug Muestra calculadas
120	32,78 32	5	6556,64	0,382	5	500,927 296	10	60,11127552	65,83
120	32,78 32	5	6556,64	0,382	5	500,927 296	10	60,11127552	65,88
120	32,78 32	5	6556,64	0,382	5	500,927 296	10	60,11127552	65,88
Error relativo general									-9,57
Desviación estándar									0,0
Promedio									65,9
CV%									0,0
máximo									65,88
mínimo									65,83
Gmax									0,753
Gmin									0,870

Tabla A3. Datos estadísticos del escualeno para determinar error relativo general, desviación estándar, promedio y porcentaje de variación.

Escualeno				Dilución					
uL	w (mg)	Volumen SLN	[mg/mL] SLN Madre	Vol. Inicial	Vol. Final	[]	Dilución Final	ug muestra	ug Muestra calculadas
220	31,581	5	6316,2	0,158	2	498,9798	10	109,775556	113,14
220	31,581	5	6316,2	0,158	2	498,9798	10	109,775556	116,94
Error relativo general									-4,80
Desviación estándar									2,7
Promedio									115,0
CV%									2,3
máximo									116,94
mínimo									113,14
Gmax									0,466
Gmin									1,677

Tabla A4. Datos estadísticos del campesterol para determinar error relativo general, desviación estándar, promedio y porcentaje de variación.

Campesterol				Dilución					ug
uL	w (mg)	Volumen SLN	[mg/mL] SLN Madre	Vol Inicial	Vol Final	[]	Dilución Final		Muestra calculadas
120	4,99 2	2	2496	0,4	2	499 ,2	10	59,904	58,89
120	4,99 2	2	2496	0,4	2	499 ,2	10	59,904	58,62
120	4,99 2	2	2496	0,4	2	499 ,2	10	59,904	58,40
Error relativo general									2,11
Desviación estándar									0,2
Promedio									58,6
CV%									0,4
máximo									58,89
mínimo									58,40
Gmax									0,998
Gmin									0,417

ANEXO: 5. Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases marca Shimadzu, modelo GC2010 Plus.



Purificación y Análisis de Fluidos S.A.S
REPORTE DE SERVICIO TÉCNICO.
 Orden de servicio nro. 14952893.
 Formato: US-FR-43-18 / Mar.2017.
 Página 1 de 3.

CIUDAD FACATATIVA	FECHA (dd/mm/aa) 15/05/2019	ORDEN DE SERVICIO N° 14952893	
CLIENTE BIO D S A	SUCURSAL BIO D S A	UBICACIÓN LAB CONTROL CALIDAD	
CONTACTO INICIAL ADRIANA MARQUEZ	DIRECCIÓN COMPLEJO ECOPETROL PLANTA MANCILLA FACATATIVA - CONTROL CALIDAD	TELÉFONO 3168696981	
EQUIPO GC-2010PLUS A OCIP TV - FID	SERIAL C11805006821	MODELO DEL EQUIPO GC-2010 PLUS	MARCA DEL EQUIPO SHIMADZU
ID DEL CLIENTE / N° INVENTARIO codigo interno 2003993	FUNCIONARIO DE SERVICIO YESID PUENTES CUELLAR	TIPO DE SERVICIO 2. PREVENTIVO - 2.12. GENERAL	
MOTIVO SERVICIO SOLICITADO servicio preventivo			
ESTADO INICIAL DEL EQUIPO: EN SERVICIO			
DETALLE ESTADO INICIAL Equipo encendido. pruebas preliminares de funcionamiento SPL 1/FID2			
DIANÓSTICO (FALLAS, CAUSAS, CONCLUSIONES) n/a.			
DESCRIPCIÓN DEL SERVICIO REALIZADO 1. Limpieza y lubricación de modulo inyector AOC 20i ok. 2. Limpieza de horno , cambio de tuerca ranurada referencia 221-32705-00 cantidad 3. 3. Limpieza y revision de JET y colector FID2. se verifica fuga en JET ,se coloca nuevo JET referencia 221-48258-91 cantidad 1. 4. Limpieza y revision de JET y colector FID1. Se limpia JET y no se detecta fuga.ok. 5. Limpieza de cubiertas ok 6. Mantenimiento de SPL 1. limpieza con acetona y cambio de liner, septa y oring y cambio de trampas de Split/purga ok. 7. Mantenimiento de OCI/PTV. limpieza de ventilador ok 8 Limpieza de liner de OCI y cambio de oring de OCI 9. Chequeo y verificacion de encendido de llama en FID2.se ajusta parametros de control de flujo de aire/ Makeup/ hidrogeno 40/30/400 ok. 10. Chequeo y verificacion de encendido de llama en FID 1. se verifica que con los parametros actuales para aire/Makeup/hidrogeno 40/30/400 opera correctamente 11. Chequeo de estabilidad y rampa de temperatura de horno.			
ESTADO FINAL DEL EQUIPO: EN SERVICIO			
ESPECIFICACIÓN ESTADO FINAL DEL EQUIPO Y RECOMENDACIONES PARA EL CLIENTE/USUARIO: equipo disponible para uso normal			
PARTES PENDIENTES POR INSTALAR ? : NO			

Figura. A2. Calificación por parte de la empresa Purificación y Análisis de Fluidos S.A.S. Al equipo de cromatografía de gases marca Shimadzu, modelo GC2010 Plus.

NRO PARTE	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRIORIDAD
-----------	-------------	----------	-----------

PARTES INSTALADAS ? : SI

NRO PARTE	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD
221-48258-91	FID JET assy	1
220-90547-00	septa termogreen Restek	2
036-11203-84	oring	1
036-11201-84	oring 4D P3	1
221-42559-92	trampa proteccion AFC	2
LABORES PENDIENTES POR EJECUTAR:		n/a

FECHA Y HORA DE INICIO :	FECHA Y HORA DE FIN :	TIEMPO DE EJECUCIÓN :
15/05/2019 08:14	17/05/2019 17:34	23:00:34
CALIDAD DEL SERVICIO	CALIFICACIÓN: 5	
CUMPLIMIENTO	CALIFICACIÓN: OPORTUNO	

OBSERVACIONES GENERALES POR PARTE DEL CLIENTE:

OBSERVACIONES GENERALES POR PARTE DEL CLIENTE MANEJO DE EPP	FIRMA DEL CLIENTE - VERIFICACION EPP
<p>¿El profesional utilizó los Elementos de Protección Personal adecuados y acorde con la labor desarrollada? SI/NO <u>SI</u></p> <p>Fecha: 17/05/2019 Hora - 17:33</p>	<p><small>Verificación del Cliente</small> Su firma da constancia de la asistencia de nuestros funcionarios de servicio técnico y la realización del servicio.</p> <p>TITO MONTENEGRO CASAS</p> <p>Fecha: 17/05/2019 17:33 Nro: 14952893/12/05/19</p> <p>tito montenegro casas</p>

Figura. A3. Calificación por parte de la empresa Purificación y Análisis de Fluidos S.A.S. Al equipo de cromatografía de gases marca Shimadzu, modelo GC2010 Plus.



IMÁGENES ASOCIADAS (Haga click en la imagen para visualizarla en tamaño original)



Firma por parte del Cliente	Nombre Cliente	Firma por parte de PAF	Nombre PAF
<p>Firma por parte del Cliente</p> <p>Su firma da constancia de la asistencia de nuestros funcionarios de servicio técnico y la realización del servicio.</p>  <p>Fecha: 17/03/2018 10:27 Nro: 14952893/1234567</p> <p>tito montenegro casad</p>	<p>Tito Montenegro</p>	<p>Firma por Purificación y Análisis de Fluidos</p> <p>Su firma da constancia de la asistencia de nuestros funcionarios de servicio técnico y la realización del servicio.</p>  <p>Purificación y Análisis de Fluidos</p> <p>Fecha: 17/03/2018 17:32 Nro: 14952893/1234567</p> <p>yesid puentes</p>	<p>YESID PUENTES CUELLAR</p>

Figura. A4. Calificación por parte de la empresa Purificación y Análisis de Fluidos S.A.S. Al equipo de cromatografía de gases marca Shimadzu, modelo GC2010 Plus.

