

RESEÑA ANALÍTICA

Obtención y determinación de ácidos grasos de muy elevada masa molecular

David Marrero Delange.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de octubre de 2005. Aceptado: 25 de febrero de 2006.

Palabras clave: ácidos grasos de muy elevada masa molecular, ceras, cromatografía de gases.
Key words: very long chain fatty acids, waxes, gas chromatography.

RESUMEN. Los ácidos grasos de muy elevada masa molecular (AGEMM) son los componentes principales de los lípidos donde ellos existen. Su diversidad en longitud de cadena, grado de insaturación, geometría y posición de los dobles enlaces, así como la presencia de otros grupos funcionales, definen sus características y posibles aplicaciones. Se presentó una visión global y algunas consideraciones importantes sobre los métodos clásicos y modernos para la extracción y purificación de los AGEMM a escala industrial y analítica, tales como: extracción con disolvente, soxhlet, lote, ultrasonido, microonda y fluido supercrítico. Se informó sobre el empleo de ceras naturales, principalmente las vegetales, como fuente de obtención de esos ácidos. En tal sentido, se ejemplificó el aislamiento de una mezcla reproducible lote a lote de AGEMM ($C_{24:0}$ a $C_{36:0}$) de la cera de caña de azúcar, llamada D003, utilizada por primera vez como potencial medicamento para el manejo de enfermedades aterotrombóticas. Esta revisión resume también, los métodos cromatográficos que están disponibles para obtener los perfiles de los AGEMM y sus aplicaciones específicas. Actualmente, estas sustancias son determinadas más frecuentemente por cromatografía gas líquido capilar (CG) como ésteres metílicos, los cuales son preparados por diversos métodos, incluyendo reacciones catalizadas por ácidos y bases. También, se señalaron los avances más recientes en los métodos de derivatizaciones como los pirolíticos, *on-column* y otros, así como sus ventajas y limitaciones. Parece que la mayoría de los métodos funcionan muy bien si se toman los cuidados adecuados. Se discutieron las debilidades más comunes en el análisis de estos ácidos por CG, que en la opinión del autor, son las etapas de: preparación, inyección, separación y cuantificación, las cuales deben ser optimizadas para obtener resultados precisos y exactos. Hoy día, la combinación de la CG con las espectroscopias FTIR, RMN 1H y ^{13}C y la espectrometría de masas y el análisis de los resultados por sistemas computarizados, se ha convertido en una herramienta indispensable para la identificación de los AGEMM. Finalmente, se deben llevar a cabo las validaciones de las metodologías analíticas y los procesos de producción para garantizar la calidad de los productos que se obtengan a partir de ellos.

ABSTRACT. Very long chain fatty acids (VLCFA) are the principal component of lipids where they exist. Their diversity in terms of chain length, the degree of unsaturation, geometry, and position of double bonds, as well as the presence of other functionalities, define their characteristics and possible applications. An overview and some important considerations about classic and modern methods of extraction and purification of VLCFA for both, the analytic and the industrial scale such as: solvent, soxhlet, batch, ultrasonic, microwave and supercritical fluid extractions was presented. The employment of natural waxes, mainly the vegetables, as a source for obtaining those acids was reported. In that sense, the isolation of a reproducible batch to batch mixture of VLCFA ($C_{24:0}$ to $C_{36:0}$) from sugar cane wax, called D003, for the first time used as a potential drug for managing atherothrombotic diseases was exemplified. This review also summarizes the chromatographic methods that are available for obtaining VLCFA profiles and the specific applications that have been reported for them. These substances are currently more frequently determined by capillary gas liquid chroma-

phy (GC) of the methyl esters which are prepared by a variety of methods, including the acid- and base-catalyzed reactions. The more recently development on-column or pyrolytic and other derivatization methods as well as their limitations and advantages were also pointed out. It appears that the majority of these methods function quite well when care is taken to use them properly. The most common weaknesses in GC analysis of these acids were discussed, in the opinion of the author, are: preparation, injection, separation and quantification steps, which must be optimized in order to get precise and exact results. Now a day, the combination of GC with FTIR, NMR 1H and ^{13}C spectroscopy and mass spectrometry and computer analysis of the resultant data, has become an indispensable tool for the identification of VLCFA. Finally, validation of manufacture process and analytical methodologies must be carried out to guarantee the quality of products that has been obtained from them.

INTRODUCCION

Los ácidos grasos (AG) son los componentes principales de los lípidos. Su diversidad en longitud de cadena, grado de insaturación, geometría y posición de los dobles enlaces, así como la presencia de otros grupos funcionales, definen sus características y posibles aplicaciones, entre las que se encuentran: productos comestibles, cosméticos, excipientes de formas farmacéuticas, ingredientes activos de fitofármacos, suplementos nutricionales, detergentes biodegradables, lubricantes, adhesivos, espesantes para pinturas, desinfectantes, seca-

dores de barniz y recubrimientos para madera, metal, frutas, vegetales y tabletas, entre otras.¹⁻³

Aunque mucho se ha escrito sobre estos compuestos, la mayoría de los artículos y libros publicados tratan sobre los AG comunes o esenciales, con cadenas inferiores a 24 átomos de carbono. Diferente es el panorama encontrado para los AG saturados superiores o de muy elevada masa molecular (AGEMM), los cuales se han referido como presentes en bacterias,⁴ en las ceras de las plantas⁵ y relacionados con enfermedades patobioquímicas como la adrenoleucodistrofia,⁶ nunca utilizados como medicamentos.

Actualmente, la industria farmacéutica cubana está interesada en la obtención de medicamentos a partir de fuentes naturales abundantes en el país. Esto, unido a que Cuba, como productora de azúcar, enfrenta el reto de diversificar su producción como respuesta a las dificultades del mercado internacional y las tendencias desfavorables de los precios, hace que se tome la estrategia de utilizar los subproductos de esta industria^{1,7} y así, dirigir los esfuerzos hacia la obtención de productos con mayor valor agregado, partiendo de criterios tecnológicos y de producciones flexibles que contribuyan a la recuperación de la economía.

En el presente trabajo se realiza una valoración acerca de las ceras como fuentes de obtención de los AGEMM, los métodos para su aislamiento, purificación, y determinación. También, se ejemplifica la obtención de una sustancia farmacológicamente activa, en desarrollo como medicamento, a partir de la utilización de un subproducto de la industria azucarera cubana.

CERAS NATURALES

Desde la antigüedad, las ceras han sido ampliamente utilizadas por el hombre, ya sea en el embalsamado de las momias, en pinturas rupestres y más recientemente, en las industrias textiles, de cosméticos y farmacéutica. Por su origen, pueden ser minerales, animales y de plantas.

Las ceras son resistentes al agua y están compuestas por series homólogas de diversas sustancias, dentro de las que se incluyen monoésteres, hidrocarburos, cetonas, aldehídos, ésteres de esteroides y triacilgliceroides, AG y alcoholes libres e hidroxiácidos. Además, terpenoides, flavonoides y compuestos no volátiles están presentes en ellas en menor cuantía.⁸⁻¹¹

En los vegetales, las ceras normalmente se encuentran recubriendo las superficies de las hojas, cortezas, frutos (como la envoltura de las semillas) y en las cutículas de los tallos. La más importante de este grupo es la de carnauba, la cual se extrae de las hojas de la palma *Copernicia prunifera* y tiene innumerables usos industriales. Otras ceras importantes son las de jojoba, oricuri, candelilla, algodón, pino, arroz y la de la caña de azúcar, a la cual, se le dará cierta relevancia en el trabajo.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE LOS ACIDOS GRASOS

Saponificación de la cera

Todas las ceras contienen ésteres de alto peso molecular, lo cual implica que para obtener los ácidos, deben ser sometidas a un proceso de hidrólisis, el cual se realiza usualmente con potasa en medio alcohólico u otro álcali y con aplicación de calor.¹² La mezcla reaccionante también ha sido sometida a un tratamiento por microondas en un reactor cerrado, lo cual es un método alternativo más rápido y seguro que la aplicación de calor, aunque hasta el presente solo se ha utilizado con fines analíticos.¹³

Separación de los AG del material insaponificable

Usualmente, para separar los AG del material insaponificable, se extrae primeramente el disolvente bajo vacío, el residuo se diluye con agua y el material insaponificable se extrae empleando disolventes orgánicos, como éter dietílico o éter de petróleo. Los AG son liberados por adición de un ácido mineral, generalmente ácido sulfúrico o clorhídrico en un 10 % en exceso. Si la cantidad de ácidos es importante, estos pueden ser separados del medio acuoso mediante reposo a bajas temperaturas.

Las fracciones neutra y ácida pueden ser separadas también por cromatografía de columna (CC) o de capa delgada (CCD),¹⁴ aunque estas técnicas son más apropiadas para fines analíticos y en ocasiones, se emplean como paso previo a la identificación por cromatografía gas líquido (CG) o CG acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).¹⁵ En sentido general, a pesar de que la CCD y la CC no garantizan una resolución exhaustiva de los componentes individuales, sí permiten el fraccionamiento de las ceras saponificadas en grupos de compuestos.

El adsorbente usualmente utilizado para la separación de ceras por CCD es el gel de sílice, aunque también se ha empleado el óxido de magnesio. Tullouch¹⁶ separó los compuestos de diversas ceras con la mezcla $\text{HCCl}_3\text{-EtOH}$ (99:1); no obstante, los recobrados de los compuestos polares, particularmente de los AG libres (AGL), fueron bajos. Por otro lado, las placas de gel de sílice impregnadas con una disolución de nitrato de plata se han empleado fundamentalmente en la separación de los AG insaturados, tanto de los isómeros de posición como de los geométricos.¹⁷

Tanto el ácido silícico como la alúmina han sido utilizados como adsorbentes en la separación por CC, sin embargo, la segunda puede descomponer algunos constituyentes¹⁸ y retiene fuertemente los compuestos oxigenados, por lo que se utiliza preferiblemente para separar los hidrocarburos de las ceras.¹¹ El ácido silícico es más apropiado para separar lípidos con C_{16} y C_{18} , pero no puede fraccionar de las ceras los componentes de más elevado peso molecular. Los AG se pueden distribuir en varias fracciones, junto con alcoholes, hidroxiésteres e hidroxi-cetonas, pero al metilarlas y recromatografiarlas, estos se separan como ésteres metílicos.¹⁶ Los AG también han sido separados en columnas de intercambio iónico y con florasil.¹⁴ Otra variante empleada es la utilización de una columna rellena con gel de sílice suspendida en hexano o cloroformo. También se ha impregnado el soporte con iones plata para la separación de los AG insaturados.¹⁹

La destilación fraccionada a presión reducida se empleó inicialmente para separar las mezclas de ácidos y ésteres de las grasas naturales saponificadas a escala de laboratorio e industrial;² pero presenta desventajas tales como que solo un grupo limitado de lípidos es volátil y como la separación de por sí es lenta, los compuestos pueden descomponerse, oxidarse o polimerizarse, e inclusive pirolizarse. Por estas razones, su uso es cada vez menos frecuente y no es aplicable a los AGEMM

Otra propiedad utilizada para la separación de los AG ha sido la solubilidad diferenciada de sus sales metálicas, en dependencia de la naturaleza del ion metálico, la longitud de la cadena, el grado de insaturación, y otras características. Las sales de plomo han sido las más uti-

lizadas con este propósito,²⁰ tanto con fines analíticos como preparativos, pero no son confiables para la separación de mezclas con ácidos superiores a C_{14} ; además, el empleo de este metal en la industria farmacéutica sería de mucho riesgo.

La separación de mezclas de AG mediante el uso de los complejos de urea y tiourea también ha sido ampliamente estudiada. La diferencia de estabilidad de los complejos es la base de estas separaciones, siendo mayor la estabilidad de compuestos de cadena lineal saturados y en menor grado, la de los insaturados y ramificados.²¹ Esta variante pudiera ser una alternativa interesante para purificar los AGEMM, no aplicada en Cuba. Antes del desarrollo de la cromatografía gas líquido (CG), se aplicó esta técnica en la identificación de los AG, y actualmente, se ha generalizado para otros grupos de compuestos.²²⁻²³

Métodos de separación de AG mediante cristalización

La cristalización de los AG y sus ésteres metílicos se ha llevado a cabo con ayuda de varios disolventes, tales como: etanol, acetona, acetona-cicloheptano, diclorometano y emulsión de aceite en agua, a diferentes concentraciones de las matrices y temperaturas.^{24,25} En general, la solubilidad de los AG en disolventes orgánicos crece con la disminución del peso molecular y con el grado de insaturación. Estos procedimientos se emplean en la extracción de los ácidos esteárico y oleico, a partir de grasas animales y aceites,²⁰ para su utilización en diversas industrias. También se han empleado para la separación de glicéridos y otras sustancias a partir de aceites vegetales.²⁶

Una dificultad de esos procesos es que los AG insaturados de cadenas largas tienden a cristalizar junto a los saturados de cadenas más cortas, por lo que en los casos en que aparecen ambos tipos de compuestos se hace necesaria la combinación de la cristalización con otras técnicas de separación.²⁷ Otro inconveniente que puede tener lugar es que la solubilidad de cada componente se vea afectada por la presencia de los otros, por lo que la solubilidad de un compuesto puro no siempre es aplicable al mismo compuesto en una mezcla. Este fenómeno es causado por la asociación de las moléculas en disolución, o por solubilización en ciertos disolventes, lo que provoca la formación

de cristales mixtos. Por ejemplo, la presencia de ácidos insaturados puede incrementar la solubilidad de otros ácidos en la mezcla. El problema de la asociación puede reducirse al cambiar el disolvente o al trabajar con los ésteres metílicos, ya que estos muestran poca tendencia a asociarse en disolución.

Métodos de extracción de AG con disolventes

La extracción de un componente con un disolvente es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o de su fuente natural. Para la separación de los AG se han utilizado diferentes métodos de extracción, entre los que se encuentran la extracción líquido-líquido y sólido-líquido.^{28,29}

La primera depende de la acción selectiva de un disolvente sobre el AG en disolución. En tal sentido, la solubilidad mutua de las mezclas de ácidos y disolventes hace que su separación sea poco eficiente,²⁰ lo cual ha limitado el empleo de estos métodos y los hace impracticables para la separación de los AGEMM. Por otra parte la extracción sólido-líquido con diferentes disolventes es ampliamente utilizada en la industria, tanto en reactor agitado como en soxhlet. La primera de esas técnicas ha permitido la obtención de productos con interés farmacéutico o nutricional, como el policosanol y el Abexol, mezclas de alcoholes grasos extraídos de esta forma de las ceras saponificadas de caña de azúcar y de abejas, respectivamente.^{30,31} La extracción con soxhlet, que combina la destilación y la extracción líquida de los componentes de forma continua, se utiliza con éxito en el aislamiento de productos a partir de vegetales y tejidos animales, aunque en ocasiones requiere tiempos prolongados.^{28,32,33} Aunque esta técnica puede ser empleada en procesos desarrollados en el laboratorio y la industria, la mayoría de los estudios en que este procedimiento se ha empleado para la extracción de AGEMM ha perseguido objetivos analíticos.³⁴

Por ejemplo: Flores aisló una mezcla de trece AGEMM saturados ($C_{24:0}$ al $C_{36:0}$) de la *Arenaria venezolana* (planta completa) utilizando cloroformo como disolvente, pero no brindó los datos acerca del tiempo de extracción, del volumen, pureza, ni recobrado.⁴⁵ Otro intento fue el realizado por Miltenberger, quien buscaba un método rápido

para caracterizar ceras vegetales, incluida la de caña de azúcar, mediante la determinación de su composición de AG.¹⁰ Las ceras saponificadas, secas y pulverizadas, se sometieron a extracción del material insaponificado con n-heptano. En el dedal quedaron las sales de los AG, las cuales se calentaron a ebullición con HCl y, posteriormente, se eliminó el exceso de HCl con agua. El producto obtenido al trabajar con la cera de caña de azúcar presentó alrededor de un 43 % de ácidos totales. En este estudio se plantea que la extracción duró varios días, sin especificar cuántos, lo que indica que el proceso es poco rentable. La ausencia de datos sobre el rendimiento obtenido y sobre la relación soluto-disolvente utilizada hace que la información resulte limitada.

El grupo de trabajo del autor ha desarrollado un procedimiento para la obtención de una mezcla de AGEMM saturados ($C_{24:0}$ - $C_{36:0}$), denominada D003,³⁶ a partir de la cera refinada de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L., en la cual los diferentes AGEMM se presentan en una composición relativa reproducible siendo el $C_{28:0}$ el componente mayoritario. Se partió de la cera refinada saponificada y los AGEMM se separaron mediante el empleo de un soxhlet y de un reactor agitado al utilizar disolventes orgánicos. Luego de lo cual los AGEMM se purificaron por medio de sucesivas cristalizaciones lo que permitió alcanzar purezas superiores al 80 %. Este proceso de obtención desarrollado en el laboratorio se escaló en plantas de producción, con lo que se logró obtener un ingrediente biológicamente activo de similar identidad y pureza al obtenido a escala de laboratorio.

El D-003 así obtenido presenta propiedades farmacológicas de interés, tales como efectos hipolipemiantes y antiagregante plaquetario demostrados en estudios experimentales y clínicos, así como un adecuado margen de tolerabilidad que justifican su desarrollo como medicamento, por lo que se encuentra en estos momentos en estudios clínicos Fase III.³⁷⁻⁴³

Técnicas modernas de extracción de AG

Entre las nuevas técnicas desarrolladas con estos fines, las más relevantes han sido las que emplean microondas,⁴⁴ fluido supercrítico (SFE)⁴⁵ y ultrasonido,⁴⁶ las que han demostrado ser cualitativa y cuan-

titativamente similares y en ocasiones, superiores a las técnicas convencionales. Así, se han logrado recobrados del 97 al 100 % al utilizar la SFE en la extracción de AG de semillas y otros productos alimenticios por lo que ha sido recientemente incluida como método oficial de la AOAC.⁴⁷ Por otro lado, la extracción de AG con metanol a partir de las flores del *Hibiscus tiliaceus* L. fue posible mediante la utilización de ultrasonido con mejor rendimiento y en menor tiempo (12,82 % y 2,3 h), que los del soxhlet (5,67 % y 40 h) y la maceración (3,67 % y 8 d) respectivamente.⁴⁸ No obstante, el empleo de estas técnicas se ha limitado al estudio analítico de mezclas de AG hasta C₂₄, se encuentra aún en fase de investigación con vistas a su posible introducción en la industria y no se ha aplicado a los AGEMM.

TECNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE AGEMM

Aunque la CG es la técnica más utilizada para el análisis cuantitativo de los AG, también es posible utilizar otros métodos cromatográficos. La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) ha sido utilizada, ya que opera a temperatura ambiente, por lo que existe poco riesgo de pérdida de compuestos lábiles y de compuestos volátiles. Además, al igual que la CG puede ser acoplada a la EM con fines de identificación o empleada con fines preparativos en la colección de fracciones que pueden ser analizadas por otras técnicas.⁴⁹

Tomando en consideración el tipo de ácido y la aplicación que se desea, se buscarán las mejores condiciones para su separación (adsorción, quiral, aplicando iones plata, etc.), así como para su detección (UV, dispersión de la luz, fluorescencia, radiactividad, etc.).^{50,51} Sin embargo, la separación de AGEMM de las ceras se dificulta por su poca solubilidad y la baja resolución que pudiera mostrar la técnica por la presencia de series homólogas de otros compuestos similares.

La cromatografía en fluidos supercríticos también se ha empleado en la separación de los AG (especialmente para grasas y aceites), aunque ha ganado en aceptación, no se ha aplicado con éxito a los compuestos de muy elevada masa molecular.^{52,53} La cromatografía por exclusión molecular ha sido usada exitosamente en el fraccionamiento de AG (C_{14:0} a C_{24:0}), compuestos

resinosos e incluso ésteres de alto peso molecular formados entre los ácidos grasos y alcoholes diterpenoides.⁵⁴ La electro-cromatografía capilar ha sido utilizada para analizar AGL y sus ésteres de fenacilo provenientes de aceites vegetales y ha mostrado ser superior a la CLAR en cuanto a eficiencia, sensibilidad y rapidez, aunque no permite obtener buenos resultados cuantitativos para ácidos superiores.⁵⁵

Análisis por CG de los AGEMM

El descubrimiento de la CG por James y Martín en 1952⁵⁶ revolucionó el análisis de los AG, convirtiéndola en la técnica más frecuentemente usada para su estudio. La CG es la técnica idónea para analizar los AGEMM, ya que permite su adecuada resolución.^{16,57} Además, el detector de ionización por llama (DILL) es robusto, tiene un amplio intervalo de trabajo lineal (10⁷), una excelente estabilidad de la línea base, una sensibilidad de 10⁻⁹ g, un pequeño volumen muerto y una relativa insensibilidad ante pequeños cambios de la velocidad de flujo de la columna,^{58,59} lo que hace que este detector sea el más utilizado en la determinación cromatográfica de los AG.

Derivatización de los AGEMM

Los AG poseen un grupo carboxilo que les confiere cierto carácter polar y la propiedad de formar dímeros con elevados puntos de ebullición, que es necesario disminuir para realizar los análisis por CG. Para ello, se convierten usualmente en compuestos más volátiles y menos reactivos como los ésteres metílicos (EMAG) u otros.^{57,60} Esto también evita su adsorción sobre las superficies por la formación de puentes de hidrógeno, lo cual provoca distorsión de las señales (colas) y la aparición de picos fantasmas, así como errores en la determinación.⁶¹

Los métodos de derivatización más comunes comprenden la esterificación de los AGL y la transesterificación de los AG enlazados, esta última generalmente se realiza de forma directa *in situ* al combinarse con la extracción en un solo paso.^{62,63} En tal sentido, las reacciones mediante catálisis ácida y básica son las que han mostrado mayor uso.

La optimización de esta etapa es de extrema importancia para la obtención de resultados cuantitativos. Así, los problemas más frecuentemente asociados a la preparación de los ésteres incluyen la conversión

incompleta de los ácidos en sus ésteres, cambios en la composición original de los ácidos, formación de artefactos que pueden llevar a una identificación errada como AG o solapamiento con los picos de los ésteres, contaminación y daño de la columna por la presencia de trazas del reactivo esterificante, extracción incompleta de los ésteres y la pérdida de los muy volátiles.

En un trabajo de Sheppard e Iverson⁶⁴ se discutieron en detalle los diversos reactivos y métodos utilizados para esos propósitos, y se concluye que “no existe un método de esterificación ideal”; sin embargo, comentan que la mayoría de los métodos son aceptables si se usan correctamente. Además, se deben tener en cuenta las características de la muestra, tales como la cantidad de AGL y el tipo de enlace de los ácidos que están enlazados, las condiciones drásticas de calentamiento y la exactitud requerida.

a) Catálisis ácida

La primera ventaja de este método es su aplicación general en la formación de ésteres metílicos, tanto para los AGL como para los AG enlazados. El trifluoruro de boro (BF₃), HCl y H₂SO₄ son los catalizadores más extensamente usados, generalmente en disoluciones metanólicas al 14, 5 y 2 %, respectivamente. No obstante, las condiciones de concentración, temperatura y tiempos de reacción descritas han sido varias.^{57,60}

El BF₃ es el catalizador más popular por su elevado poder de esterificación; mediante su empleo, los AGL, fosfolípidos, triglicéridos y los ésteres del colesterol son convertidos a 100 °C en sus correspondientes ésteres metílicos en 2, 5-10, 25, y 60 min, respectivamente,⁶⁵ y con el empleo de microondas se han alcanzado tiempos de reacción menores.⁶⁶ Las elevadas concentraciones usadas del BF₃, en comparación con otros ácidos, se justifican por sus cortos tiempos de reacción; esto último ha hecho posible su establecimiento como método por la AOCS,⁶⁷ por la AOAC⁶⁸ y por la IUPAC,⁶⁹ en todos los casos luego de realizar una saponificación de las grasas y los aceites. A pesar de lo expuesto, este no es recomendable en el estudio de ácidos con grupos funcionales poco usuales, como epóxido, ciclopropenilo, e insaturaciones acetilénicas o conjugadas, ya que al reaccionar con estos produce artefactos y atenta contra su determinación. Además, es tóxico,

caro y su tiempo de vida es limitado fuera de refrigeración ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se destruye con facilidad en presencia de agua.^{60,64} No obstante, no se encontraron referencias publicadas de su aplicación para $\text{AG} > \text{C}_{24:0}$.

Para ácidos como el HCl y el H_2SO_4 , el tiempo al menos se duplica con relación al que se necesita al utilizar el BF_3 , y para el HClO_4 ,⁵⁷ existe el inconveniente de su carácter explosivo. Otros compuestos usados como catalizadores ácidos incluyen al BCl_3 y al AlCl_3 .⁷⁰

Para muchos autores el HCl en metanol es el mejor agente esterificante con propósitos generales,^{57,60,71} y ha sido el más ampliamente usado en los procedimientos que se realizan *in situ*, debido a que probablemente es el menos afectado por las trazas de agua. Las formas de preparación preferidas han sido burbujeando HCl en MeOH y por adición de cloruro de acetilo a MeOH . Outen *et al.* utilizaron la primera variante, utilizando benceno como disolvente y calentando a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h, con la cual determinaron AG en los alimentos y en las heces de ovejas con una exactitud similar a la de los métodos convencionales de extracción con hexano, luego de la hidrólisis básica y reacción con la mezcla HCl-MeOH .⁷²

Para la determinación de AG de alto peso molecular en ceras también se han utilizado los métodos de metilación. Así, Flores burbujeó HCl en MeOH anhidro durante 8 h³⁵ y Stransky utilizó la mezcla HCl-MeOH al 5 % calentando a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h, mientras que otros han preferido dejar la reacción durante toda la noche,³⁵ con lo que lograron resultados satisfactorios. El diazometano también se ha utilizado con este propósito,¹⁶ sin embargo, para obtener resultados cuantitativos se sugiere que la reacción se lleve a cabo durante toda la noche,⁶⁴ aseveración de la que discrepa el autor, ya que ha sido corroborado por este y otros colaboradores que esta reacción ocurre instantáneamente y con eficiencia. De estos resultados se puede inferir que para metilar los AGEMM se requieren tiempos de reacción prolongados, lo cual no es factible para un método de control de calidad.

b) Catálisis básica

Las derivatizaciones en presencia de catalizadores básicos ocurren a mayor velocidad que las ácidas^{73,74} y a temperatura ambiente; no degradan los AG lábiles ni isomerizan las instauraciones,⁷⁵ por lo que se

recomiendan principalmente para AG de cadenas cortas. No obstante, su mayor limitante radica en que no son capaces de esterificar los AGL ,^{60,76} ni transesterificar los esfingolípidos,⁷⁷ que pueden provocar saponificación y requieren la ausencia de agua en las reacciones.⁷⁸ Las disoluciones de NaOH y KOH y de sus metóxidos en metanol han sido las más comúnmente usadas con estos fines;^{57,79,80} aunque las bases fuertes orgánicas (hidróxidos de amonio cuaternario, tetrametilsulfonio y tetrametilguanidina) también se han usado para transesterificar los lípidos de plantas y animales.^{81,82}

Entre los otros métodos de esterificación utilizados se tiene la metilación con diazometano, la cual es muy rápida, especialmente en la esterificación de AGL ; pero por su naturaleza explosiva y muy tóxica, así como por la poca estabilidad de este compuesto, su uso se ha visto limitado.⁶⁰ La conversión de AGL en ésteres trimetilsilil (TMS) también es muy utilizada, pues tiene la ventaja de que permite además la derivatización de otros compuestos con hidrógenos activos presentes en la muestra, caso frecuente en matrices complejas como los fluidos biológicos⁸³ y las ceras.⁸⁴ No obstante, se ha señalado, y corroborado por el autor, que para los ésteres TMS de los ácidos $> \text{C}_{20}$ ocurre una pérdida de la respuesta cromatográfica que afecta su análisis cuantitativo.^{85,86} Este reactivo resulta muy costoso y además, los ésteres TMS se hidrolizan con facilidad en presencia de humedad.

A pesar de lo descrito con anterioridad, no se encontraron trabajos donde se hubiesen comparado los métodos de derivatización para los AGEMM , por lo que el autor realizó un estudio en el que comparó cinco métodos: HCl-MeOH al 5 % (v/v), 2 h a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, el $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-MeOH}$ al 2 % (v/v), 1 h a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y extracción simultánea con hexano y con tolueno, diazometano y MSTFA $300\text{ }\mu\text{L}$ 30 min a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. De estos, se escogió el de la mezcla HCl-MeOH , por ofrecer el mejor resultado cuantitativo y la mayor precisión, además, por ser de bajo costo, fácil preparación y manipulación y conservación, al menos por un mes. Los otros agentes mostraron los inconvenientes señalados arriba.

Inyección cromatográfica de los AGEMM

El sistema de inyección es la mayor fuente de error instrumen-

tal en CG e influye en la precisión y la exactitud de los resultados. Las cámaras de vaporización, ampliamente utilizadas, pueden cambiar la composición de la muestra al pasar de la jeringuilla a la columna,⁸⁷ debido a procesos de descomposición térmica y catalítica en el inyector,⁸⁸ así como a procesos de discriminación y retrodifusión.⁸⁹ Estos fenómenos resultan especialmente importantes cuando los componentes de la muestra analizada presentan un amplio intervalo de volatilidades como las mezclas de AGEMM presentes en las ceras.

El proceso de evaporación durante la inyección causa discriminación, debido a que mientras ocurre una transferencia rápida de los compuestos más volátiles a la cámara de vaporización, los de mayor punto de ebullición, al evaporarse más lentamente, quedan parcialmente dentro de la aguja de la jeringuilla.⁹⁰ La naturaleza del disolvente, el gradiente dentro de la aguja, así como la técnica de inyección influyen en este proceso.^{91,92} Esta vaporización selectiva, que provoca una disminución en la respuesta cromatográfica (R_c) al aumentar el peso molecular en una serie homóloga, constituye el principal factor de pérdida de masa en el proceso cromatográfico.⁹⁰

Aunque estos problemas no han podido ser completamente eliminados, se ha logrado su disminución mediante la utilización de diversos modos de inyección entre los que pudiera citarse el *solvent-flush*,⁵⁷ así como con diferentes sistemas de introducción, como el de vaporización con temperatura programada y el *on-column*.^{93,94} Este último, si bien reduce considerablemente la discriminación, presenta algunas desventajas instrumentales, así como riesgos de contaminación de la columna, incluso con materiales no volátiles. El grado en que los procedimientos anteriormente señalados logran mejorar el comportamiento cromatográfico de la mezcla está en dependencia de las condiciones experimentales y de la muestra utilizada, por lo que para poder aplicarlos se impone el estudio de cada caso en particular.

Estudios realizados por Marbot *et al.*,⁹⁵ demostraron que la temperatura del inyector también influye en la magnitud de esos efectos, tanto para columnas capilares con divisor de flujo como para columnas de relleno; lo que constituye una fuente de errores cuantitativos, aún

cuando se emplee el método del patrón interno. Se ha podido comprobar además, que estos efectos son mayores para las columnas capilares que para las de relleno, ya que estas últimas no se ven afectadas por efectos de recondensación y tienden a una estabilización de la respuesta para temperaturas iguales o superiores a la temperatura de ebullición del componente más volátil de la mezcla. No obstante, la técnica de inyección preferida, se recomienda su automatización para minimizar los errores aleatorios.

Ulberth y Scharamel,⁹⁶ también evaluaron el efecto discriminatorio mediante diversas técnicas de inyección al analizar AG (C_{40} a C_{181}), e hicieron un diseño experimental donde evaluaron (temperatura del inyector, diseño del vaporizador, velocidad de penetración y flujo del *split*). Ellos demostraron que la inyección por *solvent flush* fue la más apropiada con recobrados del 99,44 % y CV < 2 %, y que una elevada temperatura en el inyector (330 °C) es lo importante para lograr una buena exactitud, si bien demanda una penetración rápida del *septum* para evitar la discriminación en la aguja, por lo que recomiendan el uso de inyectores automáticos que realicen la inyección en menos de 0,2 s; mejoren la productividad y disminuyan los errores inherentes a la inyección manual. Además, como otros autores, ellos sugieren que una temperatura del inyector algo menor (280 °C) combinada con una velocidad de penetración regular, también fueron efectivas para evitar la discriminación sin pérdida en la exactitud.⁵⁷

Resultados similares, pero para AGEMM patrones ($C_{24:0}$ al $C_{30:0}$) no estudiados anteriormente, fueron logrados por el autor, con lo que demostró que el uso de una inyección rápida y una técnica de *solvent flush* contribuyen a la disminución del efecto discriminatorio, lo cual permitió una mejor cuantificación de los AGEMM presentes en el D003.⁹⁷

Separación de los AGEMM

Actualmente, la elevada capacidad de resolución de las columnas capilares de cuarzo (CCC) permite que la separación de mezclas complejas de EMAG se lleve a cabo de manera rutinaria en un laboratorio. Aunque la literatura está repleta de discusiones metodológicas para reemplazar las columnas rellenas (CR), aún existen muchos laborato-

rios, incluido el del autor, que se muestran renuentes a abandonarlas, independientemente de su menor poder de resolución respecto a las capilares, ya que los métodos basados en columnas de relleno han mostrado resultados confiables y reproducibles para el control de la calidad de materias primas y formas terminadas como el policosanol,⁹⁸ y el Abexol,⁹⁹ lo que ocurre de igual modo para el D003.¹⁰⁰

No obstante, se han desarrollado columnas capilares tipo *widebore* (WB), en las que se centrará la discusión, que a pesar de tener menor capacidad que las CR han mostrado ventajas como: mayor rapidez del análisis, resolución, inercia, estabilidad química y térmica, flexibilidad, facilidad de instalación. También una vida más prolongada y mayor reproducibilidad.¹⁰¹ Estas columnas se encuentran disponibles entre 10 y 30 m de longitud, sin embargo, las de 10 m muestran capacidades similares a las columnas analíticas de 3 m x 2 mm de diámetro interno (d.i.), rellenas con un 3 a un 5 % de fase estacionaria.

A pesar de que las WB presentan mayor velocidad de análisis su resolución no decrece y debido a su inercia, se eliminan las colas y la degradación de la muestra.

Las CR por su capacidad pueden asumir muestras concentradas, pero por ser menos eficientes e inertes que las CCC y las WB son frecuentemente inapropiadas para resolver componentes minoritarios. Por otro lado, las columnas WB con d.i. entre 0,53 y 0,75 mm combinan la elevada eficiencia con la gran capacidad de muestras y presentan límites de detección como las CCC (0,25 a 0,32 mm d.i.); pero pueden aceptar hasta 15 000 ng por componente.¹⁰²

Según sea el tipo de muestra y las características de los EMAG que la componen, la separación de estos se llevará a cabo en columnas con fase estacionaria apolar,¹⁰³ medianamente polar¹⁰⁴ o muy polar,¹⁰⁵ por lo que con el aumento del largo de la columna, se incrementa la resolución, pero también el tiempo de retención; lo cual establece la necesidad de un compromiso entre minimizar el tiempo del análisis y lograr una separación aceptable.¹⁰⁶

Las columnas con fases estacionarias no polares como las metilsiliconas (SE-30, Dexil 300, OV-101, etc.) son las más usadas, debido a que exhiben mayor estabilidad térmica e inercia química, amplio intervalo

de temperaturas de trabajo y poco sangrado y por tanto, mayor tiempo de vida que las polares, cualidades que las convierten en las más apropiadas para el análisis de los AGEMM.^{57,107} Sin embargo, se recomiendan para los isómeros de los EMAG insaturados, ya que los EMAG eluyen según sus puntos de ebullición, y los componentes insaturados lo hacen primero que los saturados de igual longitud de cadena. Las columnas con fases estacionarias de polaridad intermedia, específicamente las de polietilenglicol, son utilizadas en los métodos de la AOAC para análisis de lípidos de origen marino.¹⁰⁸

La elección de una columna depende de las características de la muestra, prevaleciendo el criterio del analista, es por ello que recientemente se han construido algunas columnas de propósitos específicos como la de OV-1701-OH (8 % de metil, 7 % cianopropil, 5 % polisiloxano) para separar compuestos de muy alto peso molecular (ésteres de ceras hasta C_{58} , hidrocarburos C_{15-40} , triglicéridos, metilcetonas hasta C_{37} , alcoholes hasta C_{40} y ésteres de triterpenos como el estearato de amirilo) al trabajar a una temperatura de 390 °C.¹⁰⁹ También se ha construido otra columna capilar en la que la sílice fundida es recubierta con aluminio, lo cual eleva su estabilidad térmica hasta los 440 °C, permitiendo el análisis de triglicéridos y otros ésteres.¹¹⁰ EL autor ha trabajado con columnas WB de fases estacionarias apolares como DB-5 y las BPX-5, las que han mostrado bajo sangrado, buena inercia química y estabilidad térmica hasta 360 °C, así como un tiempo de vida útil de aproximadamente 5 años, en las cuales se han analizado matrices tan complejas como ceras y fluidos biológicos (plasma y suero), así como materias primas, de elevada pureza, provenientes de fuentes naturales utilizadas en la producción de medicamentos o suplementos nutricionales.¹¹¹ También, existen en el mercado columnas con fases estacionarias específicas para la separación de AGL, como las FFAP,⁵⁷ sin embargo, por su baja estabilidad térmica no se han utilizado en el análisis de AGEMM.

Identificación de los AGEMM

La identificación de los AGEMM o sus derivados puede basarse en la comparación de sus tiempos de retención relativos (TRR) con los de patrones analizados en las mismas

condiciones. También se ha recomendado la comparación con muestras naturales bien caracterizadas o certificadas, como los aceites de hígado de bacalao y canola.^{57,112} Los datos de retención se pueden consultar en la literatura, ya sea como retenciones relativas o, preferiblemente, por la longitud equivalente de cadena (LEC).^{113,114} Esta última resulta semejante a los índices de retención de Kováts¹¹⁵ y se basa en una relación lineal entre los logaritmos de los tiempos de retención ajustados ($\log t_r'$) de una serie homóloga de compuestos (EMAG saturados lineales) y la longitud de sus cadenas carbonadas. Las mediciones de LEC resultan válidas al realizar la medición de forma isotérmica para una fase estacionaria en particular y bajo las mismas condiciones y han sido ampliamente estudiados para las columnas capilares y de relleno.⁵⁷

Aunque la identificación por comparación con sustancias de referencia mediante los TRR y la LEC es ampliamente usada, esto es solo tentativo, debido a que cualquier contaminante puede comportarse como el analito de interés, máxime si se está en presencia de muestras complejas. Por lo tanto, la identificación debe confirmarse mediante el acoplamiento de la CG a la detección selectiva por EM.

La mayor aplicación de la CG-EM ha radicado en la determinación de la posición y geometría de los dobles enlaces, además, se han localizado AG con anillos de ciclopropano, cadenas ramificadas y otros sustituyentes. A todo ello ha contribuido la formación de los derivados de aminas y ésteres de nitrógeno que contienen OH en sus estructuras como pirroles, ésteres picolinílicos, oxazolinas y dietilamida.^{60,116} El acoplamiento de la CG a otras técnicas espectroscópicas como la infrarroja con transformada de Fourier, y la de resonancia magnética nuclear complementan la identificación inequívoca de los AG.^{57,117}

Determinación de los AGEMM

Aunque se ha realizado un gran número de trabajos analíticos que involucran mezclas de AG alifáticos superiores, se le ha prestado muy poca atención a los aspectos cuantitativos del análisis, limitándose a referir la determinación de la composición porcentual de las mezclas, utilizando el método de normalización interna, con el cual se considera que la respuesta cromatográfica

($R_c = \text{área/masa}$) es la misma para todos los ácidos a medir.⁵⁷ Sin embargo, es conocido que al cuantificar compuestos de gran punto de ebullición y que presentan un grupo polar, en mezclas que además contienen compuestos más volátiles, usualmente son encontradas concentraciones menores que las reales. Esta dificultad se incrementa para muestras que presentan compuestos no volátiles, como las ceras, los cuales no se observan en el cromatograma.

Teniendo en cuenta lo anterior, para lograr la determinación exacta de una mezcla de AG, hay que valorar si para el sistema elegido es necesario derivatizar los compuestos a medir, optimizar los parámetros experimentales para reducir los procesos discriminatorios y corregir la R_c observada para cada compuesto. Este último aspecto se puede realizar satisfactoriamente al utilizar el método del patrón interno,¹¹⁸ mediante el uso de los factores máscicos de respuesta relativa (f_i^m), los cuales pueden ser hallados con patrones de referencia de los compuestos a medir y de los patrones internos (PI) a utilizar; sin embargo, para la determinación de AG > C_{26:0} no se han encontrado ejemplos de su utilización.

Miltenberger analizó los ácidos constituyentes de ceras vegetales utilizando el eicosanoato de metilo como PI y asumió un mismo f_i^m para todos los AG, sin tener en cuenta el efecto discriminatorio causado según los diferentes pesos moleculares de estos. Tampoco ofreció datos sobre la precisión.¹⁰

Muchos autores han utilizado compuestos de otros grupos como PI para cuantificar los de determinada serie homóloga, sin tener en cuenta que las R_c son completamente diferentes para cada grupo de sustancias, lo cual da lugar a un error cuantitativo.^{118,119} Así, los AG de la cera de abejas *Apis mellifera* se determinaron empleando el eicosano como PI¹²⁰ y en la USP 26 se utiliza el nonano para cuantificar los AG del aceite de *Serenoa Repens*.¹²¹ También, Grob *et al.*¹²² determinaron la composición de la mezcla de alcoholes del aceite de oliva, mediante el uso del colesterol como PI.

Al analizar matrices complejas como las ceras, se ha descrito que diversas sustancias de elevado peso molecular no están disponibles como patrones puros, por lo tanto, su estimación cuantitativa exacta se

vuelve difícil al no poder hallar su f_i^m experimentalmente. No obstante, se han desarrollado algunas alternativas para solucionar este problema, dentro de las cuales se encuentran los métodos teóricos mediante los que se pueden predecir los f_i^m cuando se utiliza el DILL.¹²³⁻¹²⁵ Sin embargo, la exactitud de estos métodos radica en sus capacidades de predicción. Así, el método de regresión lineal no siempre ofrece un resultado exacto para el f_i^m , debido en lo fundamental a la variabilidad de la respuesta respecto a la masa según la técnica de inyección utilizada. No obstante, el autor desarrolló un método para la predicción de los f_i^m de un compuesto o varios no disponibles. Este se denominó Método de Correlación del Conjunto, el cual al graficar las respuestas molares relativas de los AG patrones en función de sus masas moleculares permitió obtener los f_i^m con buena correlación ($r = 0,998$), precisión (CV = 0,55 %) y exactitud (ER = 0,5 %).¹²⁶

Otra solución fue desarrollada por Severson *et al.*,¹²⁷ los cuales determinaron la composición de alcoholes grasos del tabaco. Estos se analizaron como derivados TMS y el 1-pentacosanol fue utilizado como PI, con el cual se calcularon los f_i^m de los patrones disponibles. Para los compuestos de los que no existían patrones se consideraron los f_i^m calculados para los más cercanos de menor número de átomo de carbono. De esta forma, se determinaron los componentes mayoritarios de la mezcla (C₂₂ a C₂₈), con mayor grado de exactitud que en otros trabajos; pero la precisión promedio de la determinación fue muy baja (CV = 10 %).

Recientemente, González *et al.*¹²⁸⁻¹³⁰ han aplicado esta variante para determinar los alcoholes del policosanol (C₂₄ a C₃₄) en materia prima y en formas terminadas (tabletas de 5 y 10 mg). Ellos utilizaron el f_i^m del C₂₈ para determinar el C₂₉, y el del C₃₀ para el C₃₂ y C₃₄, obteniendo resultados con buena precisión y exactitud, que dan fe del cumplimiento de los requisitos para el control de calidad establecidos por organismos como la AOAC y entidades reguladoras en Cuba y en otros países donde se encuentran registrados esos productos.

La experiencia anterior fue aplicada por el autor en la determinación de los AG (C₂₄ a C₃₆) que constituyen el D003. Debido a que no existían patrones comerciales disponibles de los AG C_{32:0}, C_{33:0}, C_{34:0}, C_{35:0} y C_{36:0}, se

utilizó el f_i^m del patrón $C_{30:0}$ para los ácidos pares ($C_{32:0}$, $C_{34:0}$ y $C_{36:0}$) y el f_i^m del $C_{31:0}$ para los impares ($C_{31:0}$, $C_{33:0}$ y $C_{35:0}$), lo que permitió obtener resultados precisos y exactos en la validación de metodologías analíticas para el ingrediente activo y la forma terminada que puedan ser usadas en el control de la calidad y los estudios de estabilidad de ese producto.^{111,126,131} También se encontró que los f_i^m de los patrones disponibles ($C_{24:0}$ al $C_{31:0}$) hallados experimentalmente, no se diferenciaban estadísticamente de los f_i^m teóricos propuestos por Akcman,¹¹⁴ lo que indica que el efecto discriminatorio en la introducción de las muestras fue eliminado, hecho que contribuyó a la obtención de los resultados antes mencionados.

Un enfoque que plantea ser superior a los antes mencionados, ha sido el denominado método de "los corchetes", donde se emplean series de patrones de ácidos saturados impares ($C_{5:0}$ a $C_{17:0}$), para determinar los saturados medios ($C_{6:0}$ a $C_{12:0}$), con lo cual se lograron buenos recobrados (100 a 113 %) y precisiones (0,6 a 8,0 %) con mezclas modelo y se logra resolver el problema de la discriminación.¹³² Sin embargo, para compuestos de muy elevadas masas moleculares, de los cuales no se cuenta con patrones, esto resulta impracticable.

Adicionalmente a las dificultades para la determinación de mezclas de AGEMM ya discutidas, se debe considerar que en este caso, los métodos analíticos a desarrollar deben tener el grado de exactitud y precisión requeridos por la industria farmacéutica actual. Tanto en la determinación de dicha mezcla en la materia prima, como en la forma terminada, ya sea en los estudios de estabilidad o en el proceso de control de la calidad, va a ser de suma importancia la confiabilidad en los métodos de análisis desarrollados, pues de los resultados con ellos obtenidos, va a depender lo acertado de las conclusiones de un estudio o de una decisión al aceptar o rechazar un lote de producción.

CONCLUSIONES

La determinación de los AGEMM reviste gran importancia debido a sus diversas aplicaciones, sobre todo, en el campo de la industria farmacéutica y alimentaria. Para estas aplicaciones, se establecen nuevos retos en la implementación de modernas tecnologías para el aisla-

miento, purificación y determinación de estos ácidos, como la separación y extracción con fluido supercrítico. La CG es actualmente la técnica más utilizada para la determinación de los AGEMM, sin embargo, su análisis mediante otras técnicas, inclusive híbridas con la CG, ha ganado en interés. Las columnas capilares modernas y sus fases estacionarias brindan un gran poder de separación inclusive en aplicaciones específicas para la mayoría de los AG que se encuentran en la Naturaleza. Los objetivos primarios del desarrollo de nuevos métodos o de perfeccionar los ya establecidos son el incremento de rapidez, sensibilidad y sencillez de los análisis. La rapidez se puede ganar mediante preparaciones fáciles, con irradiación de microondas en lugar de calentamiento convencional, o por optimización de variables mediante sistemas computadorizados. Se deben considerar procedimientos con pocas etapas de preparación, con el mínimo consumo de reactivos, tiempo y energía, así como en lo posible automatizables para lograr resultados cuantitativos eficaces. Las metodologías analíticas y los procesos de producción relacionados con los AGEMM deben ser validados para garantizar la seguridad y fiabilidad de los productos que los contengan.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Esteban Pérez Fernández, Director de Redacción de la Editorial CENIC, por sus oportunas sugerencias en la elaboración de este artículo.

BIBLIOGRAFIA

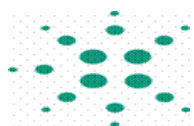
- García A. *et al.* Manual de los derivados de la caña de azúcar, 3ra Edición, Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar, Cuba, Capítulo 5, 359, 2000.
- Gunstone F.D. An introduction to the chemistry of fats and fatty acids. Chapman and Hall Ltd., London UK, 1958.
- Enciclopedia Encarta, Microsoft Corporation, 2005.
- Rezanka T. Very long chain fatty acids from the animal and plant kingdoms, **Prog. Lipid Res.**, **28**, 147-187, 1989.
- Tulloch A.P. Gas chromatographic analysis of Natural Waxes, **J. Chromatogr. Sci.**, **13**, 403-407, 1975.
- Man-Jeong P., Kyung L. and Ho-Sang S. Determination of very-long-chain fatty acids in serum by gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection following cyanomethylation. **J. Chromatogr. B**, **721**, 3-11, 1999.
- Paturau J.M. By-products of the cane sugar industry. Elsevier Comp., Amsterdam, The Netherlands, 1-22, 1969.

- Hamilton R.J. (Editor) Waxes: Chemistry, molecular biology and functions. The Oily Press, Dundee, UK, 10-34, 1995.
- Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie. Plantes médicinales, 3th Ed., Technique & Documentation-Lavoisier, France, 102-120, 2001.
- Miltenberger K.H. Estudio de ceras naturales, Congreso de Química analítica, Mainz, Alemania, 774-789, 1967.
- Tulloch A.P. Composition of some natural waxes, Prairie Regional. As appeared in Cosmetics and Perfumery for November, 89: 53-54, 1974.
- Warth H.A. The Chemistry and technology of waxes, 2nd. Ed., New York, Reinhold Publishing Corporation, 88, 76-121, 154, 1956.
- Pineiro-Avila G., Salvador A. and De la Guardia M. Microwave-assisted saponification of animal greases for cholesterol determination. **Anal. Chim. Acta**, **371**, 297-303, 1998.
- Kolattukudy P.E. Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes, Elsevier, Amsterdam, 253, 1976.
- Murphy R.C., Fiedler J. and Hevko J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry, **Chem. Rev.**, **101**, 479-526, 2001.
- Tulloch A.P. Gas chromatographic analysis of natural waxes, **J. of Chromatogr. Sci.**, **13**, 403-407, 1975.
- Thin-Layer Chromatography Handbook, Egon Stahl Ed, Springer-Verlag, New York, USA, 394-402, 1969
- Ebeler S.E. and Ebeler J.D. SPE methodologies for the separation of lipids, **INFORM**, **7**, 1094-1103, 1996.
- Ruiz-Gutiérrez V. and Perez-Camino M.C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. **J. Chromatogr. A**, **885**, 321-341, 2000.
- Markley K.S. Fatty Acids, Markley ed., Interscience Pub., Part 3, 1223, 1964.
- Knight H.B. *et al.* Dissociation temperatures of urea complexes of long-chain fatty acids, esters, and alcohols, **Anal. Chem.**, **24**, 1331-334, 1952.
- Iverson J.L. and Harril P.G. Fatty acid composition of Palm Kernel, Illipe, and Shea Nut Oils by urea fractionation and programmed temperature gas chromatography, **J. AOCS**, **50**, 1335-1338, 1967.
- Fernández-Bertrán J., Alfonso L., Alvarez J. and Reguera E. Mechanochemical síntesis of urea adducts with long chain alkyl derivatives. **J. of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, **37**, 131-136, 2000.
- Maeda K., Nomura Y., Tai K., Ueno Y., Fukui K. and Hirota, S. New Crystallization of Fatty Acids from Aqueous Ethanol Solution Combined with Liquid-Liquid Extraction. **Chem. Res.**, **38**, 2428-2433, 1999.
- Fouad F.M., Mamer O.A., Sauriol F. and Shahidi F. Effect of crystallization time on composition of butter oil in acetone. **Dev. Food Sci.**, **40**, 647-657, 1998.

26. Gunstone F. Recent Advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids (T. Galliard and Mercer Eds.), Academic Press, London, UK, 21-42, 1975.
27. Pinuly P. and Grill C.M. Purification of erucic acid by preparative high-performance liquid chromatography and crystallization, **J. of Chromatography**, **590**, 139-145, 1992.
28. Miranda M., Cuéllar A. Farmacognosia y Productos Naturales. Editorial Félix Varela. 1ra edición, Ciudad de La Habana, 1-60, 2001.
29. Brewster R., Vanderwerf C. and McEwen W. Curso práctico de Química Orgánica. Editorial Científico Técnica, ICL, La Habana, Cuba, 1971.
30. Laguna A. *et al.* A mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses, US Patent 5,663,156.
31. Magraner J. *et al.* A natural mixture composed of higher primary aliphatic alcohols obtained from beeswax for the treatment of gastric and duodenal ulcers, that also presents anti-inflammatory activity; CU 22 412, USA 6,235,795.
32. Dobush G.R., Ankney D., and Kremetz D.G. The Effect of Apparatus, Extraction Time, and Solvent Type on Lipid Extractions of Snow Geese, **Can. J. Zool.**, **63**, 1917-1920, 1985.
33. Brooks S.P.J., Ratnayake W.M.N., Lampi B.J., and Hollywood, R. Measuring Total Lipid Content in Rat Carcasses: A Comparison of Commonly Employed Extraction Methods. **J. Agr. Food Chem.**, **46**, 4214-4217, 1998.
34. Melicchi M.I.S., Caramá E.B., Miranda M., Abad F.C. y Sini P.P. Estudio por CG-EM del extracto obtenido con n-hexano por diferentes métodos de extracción a partir de las flores de *Hibiscus tiliaceus* L., **Revista Cubana de Química**, **13**, 406, 2001.
35. Flores S.E. and Medina I.D. Fatty acids obtained from *Arenaria venezuelana* F. Jahnii, **Acta Cient. Ven.** **22**, 147-148, 1971.
36. González L., *et al.* (Laboratorios DALMER S.A.), Mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax, Patent CU 22,723; US 6, 486, 205; EP 0969827 B1.
37. Menéndez R. *et al.* Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Pharmacol. Res.**, **44**, 299-304, 2001.
38. Gámez R. *et al.* Comparison of the cholesterol-lowering effects and toxicity of D-003 and lovastatin on rabbits. **Drug R&D.**, **4**, 219-29, 2003.
39. Arruzazabala M.L. *et al.* Effects of D-003, a new compound purified from sugar cane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers. A randomised double-blind clinical study. **Clin. Drug Inv.**, **23**, 107-118, 2003.
40. Molina V., Arruzazabala M.L., Carvajal D., Más R. and Valdés S. Antiplatelet and antithrombotic effects of D003. **Pharm. Res.**, **42**, 137-143, 2000.
41. Castaño, G, Menéndez R, Más R. *et al.* Effects of D-003 on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. **Clin. Drug Invest.**, **23**, 93-03, 2003.
42. Gámez R., Más R., Noa M. *et al.* Effects of chronic administration of D-003, a mixture of sugar cane wax high molecular weight acids, in beagle dogs. **Drugs Exp. & Clin. Res.**, **30**, 75-88, 2004.
43. Rodríguez M.D., González J.E., Alemán C. *et al.* Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats and rabbits. **Food Chem Toxicol.**, **42**, 1977-1985, 2004.
44. Paré J.R.J., Matni, G., Bélanger, J.M.R., Li K., Rule C., and Thibert B. Use of the Microwave-Assisted Process in Extraction of Fat from Meat, Dairy, and Egg Products Under Atmospheric Pressure Conditions. **J. AOAC Int.** **80**, 928-933, 1997.
45. Berg H., Magard M., Johansson G., and Mathiasson, L. Development of a Supercritical Fluid Extraction Method for Determination of Lipid Classes and Total Fat in Meats and Its Comparison with Conventional Methods. **J. Chromatogr.**, **785**, 345-352, 1997.
46. Lewis T., Nichols P.D., McMeekin T.A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **J. Microbiol. Methods**, **43**, 107-116, 2000.
47. Hopper M.L., King J.W., Johnson J.H., Serino A.A., and Butler R.J. Multivessel Supercritical Fluid Extraction of Food Items in Total Diet Study, **J. AOAC Int.**, **78**, 1072-1079, 1995.
48. Melecchi M.I.S. *et al.* Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers: study of extraction methods, **J. of Separat. Sci.**, **25**, 86-90, 2002.
49. Rezanka T. Identification of fatty acids longer than C₃₂ in a sulfate-reducing bacterium by reversed-phase high-performance liquid chromatography and GC-MS, **J. of Chromatogr.**, **508**, 275-277, 1990.
50. Brown P.R., Beebe J.M., and Turcotte J. The separation and characterization of long-chain fatty acids and their derivatives by reversed phase High Performance Liquid Chromatography, **Anal. Chem.**, **21**, 193-208, 1989.
51. Zamir I. and Grushka E. Separation and determination of saturated very-long-chain free fatty acids in plasma of patients with adrenoleukodystrophy using SPE and High Performance Liquid Chromatography, **J. of Chromatogr. B.**, **567**, 319-330, 1991.
52. Sakaki K. Supercritical fluid chromatography separation of Fatty acid methyl esters on aminopropyl-bonded silica stationary phases, **J. of Chromatography**, **648**, 451-457, 1993.
53. Taylor S.L., Eller F.J. and King J.W. A comparison of oil and fat content in oilseeds and ground beef- using supercritical fluid extraction and related techniques, **Food RS. International**, **30**, 365-369, 1997.
54. Nogueira J.M.F., Pereira J.L.C and Sandra P. Chromatographic methods for the analysis of crude Tall-oil, **J. High Resol. Chromatog.**, **18**, 425-432, 1995.
55. Dermaux A., Sandra P. and Feraz V. Analysis of free fatty acids and fatty acid phenacyl esters in vegetable oil and margarine by capillary electrochromatography, **Electrophoresis**, **20**, 74-79, 1999.
56. James A.T. and Martín A.J.P. Gas-liquid partition chromatography: The separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid, **J. Biochem.**, **50**, 679, 1952.
57. Christie W.W. (Ed.) Gas Chromatography and Lipids, The Oily Press, Ayr, Scotland, 66-70, 1989.
58. Sandra P. and David F. Recent developments in capillary gas chromatography, Research Institute for Chromatography, Kortrijk, Belgium, 1999.
59. Poole C.F. and Poole S.K. Chromatography today. 2 Edition, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 158, 1994.
60. Carrapiso A.I. and García C. Development in lipid analysis: Some new Extraction techniques and *in situ* transesterification, **Lipids**, **35**, 1167-1177, 2000.
61. Ackman R. G. Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Chapter III, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, 47-65, 2000.
62. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In Advances in Lipid Methodology-Two (Edited by Christie W.W.), Oily Press, Dundee, 69-112, 1993.
63. Eder K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters, **J. Chromatogr. B**, **671**, 113-131, 1995.
64. Shepard A.J. and Iverson J.L. Esterification of fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis, **J. Chromatog. Sci.**, **13**, 448-452, 1975.
65. Morrison W.R., and Smith L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol, **J. Lip. Res.**, **5**, 605-608, 1964.
66. Banerjee P, Dawson G. and Dasgupta A. Enrichment of saturated fatty acids containing phospholipids in sheep brain serotonin receptor preparations Use of microwave irradiation for rapid transesterification of phospholipids, **Biochim. Biophys. Acta.**, **1110**, 65-74, 1992.
67. Official and Tentative Method of the American Oil Chemists Society. Champaign, IL Revised to 1989 Ce-2-66, 1969.
68. Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis, 16 edn., Method 996.01, AOAC International, Gaithersburg, Marcel Decker, 1995.
69. IUPAC Standard methods for analysis of oils, fats and derivatives, Applied Chemistry Division, Commission on oils, fats and derivatives, Part I (Sections 1 and 2) Pergamon Press,

- Oxford, 6 Ed, Method 2.301, Section 3, 1979.
70. Segura, R. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters by Direct Transesterification of Lipids with Aluminium Chloride-Methanol, **J. Chromatogr.**, **441**, 99-113, 1988.
 71. Ulberth F., and Henninger M. One-Step Extraction/Methylation Method for Determining the Fatty Acid Composition of Processed Foods, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **69**, 174-177, 1992.
 72. Outen G.E., Beever D.E., and Fenlon J.S. Direct Methylation of Long-Chain Fatty Acids in Feeds, Digesta and Feces Without Prior Extraction, **J. Sci. Food Agr.**, **27**, 419-425, 1976.
 73. Ichihara K., Shibahara A., Yamamoto K., and Nakayama T. An Improved Method for Rapid Analysis of the Fatty Acids of Glycerolipids, **Lipids** **31**, 535-539, 1996.
 74. Ayorinde F.O., Clifton J. Jr., Afolabi O.A., and Sheppard R.L. Rapid Transesterification and Mass Spectrometric Approach to Seed Oil Analysis, **J. Am. Oil Chem. Soc.** **65**, 942-948, 1988.
 75. Suter B., Grob K., Pacciarelli B., and Novosalac A. Determination of Fat Content and Fatty Acid Composition Through 1-min Transesterification in the Food Sample. II. Solubilization of the Fat, Results, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **88**, 259-276, 1997.
 76. Park P.W., and Goins R.E. In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods, **J. Food Sci.**, **59**, 1262-1266, 1994.
 77. MacGee J., and Williams M.G. Preparation of Sphingolipid Fatty Acid Methyl Esters for Determination by Gas-Liquid Chromatography, **J. Chromatogr.**, **205**, 281-288, 1981.
 78. Suter B., Grob K., and Pacciarelli B. Determination of Fat Content and Fatty Acid Composition Through 1-min Transesterification in the Food Sample: Principles, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **204**, 252-258, 1997.
 79. Bannon C.D. *et al.* Analysis of Fatty Acid Methyl Esters with High Accuracy and Reliability. III. Literature Review of and Investigations into the Development of Rapid Procedures for the Methoxide-Catalysed Methanolysis of Fats and Oils, **J. Chromatogr.**, **247**, 71-89, 1982.
 80. Cantellops D., Reid A.P., Eitenmiller R.R., and Long A.R. Determination of Lipids in Infant Formula Powder by Direct Extraction Methylation of Lipids and Fatty Acid Methyl Esters (FAME) Analysis by Gas Chromatography, **J. AOAC Int.**, **82**, 1128-1139, 1999.
 81. Fourie P.C., and Basson D.S. Application of a Rapid Transesterification Method for Identification of Individual Fatty Acids by Gas Chromatography on Three Different Nut Oils, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **67**, 18-20, 1990.
 82. Schuchardt U., and Lopes O.C. Tetramethylguanidine Catalyzed Transesterification of Fats and Oils: A New Method for Rapid Determination of Their Composition, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **65**, 1940-19401, 1988.
 83. Marrero D. and González L. Trace determination of 1-octacosanol in rat plasma by solid-phase extraction with Tenax GC and capillary gas chromatography. **J. Chromatogr. B.**, **762**, 43-49, 2001.
 84. Deroux M., González V.L., y Magraner J. Desarrollo y validación de una metodología analítica por cromatografía gaseosa para la determinación de alcoholes totales en cera de abejas, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **31**, 1, 23-26, 2000.
 85. Donike M. Test mixture for gas chromatography, *Chromatographia*, **6**, 190-192, 1973.
 86. Mol H.G.J., Jansen H.G., Cramers C.A. and Brinkman U.A. Th. Large volume sample introduction using temperature programmable injectors: Implications of liner diameter., **J. of High Resol. Chromatogr.**, **18**, 19-27, 1995.
 87. Grob K. and Rennhard S. Evaluation of syringe-handling techniques for injections into vaporizing GC injectors, **J. of High Resol. Chromatogr.**, **3**, 627-633, 1980.
 88. Mares P., Tvřzicka E. And Tamchyna V. Automated quantitative gas-liquid Chromatography of intact lipids, *J. Chromatogr.*, **146**, 241-251, 1978.
 89. Grob K. Jr. and Neukom H. P. Comparison of some quantitative result obtained with non-vaporizing cold on-column and vaporizing split-splitless injection techniques, **J. of High Resol. Chromatogr.**, **2**, 15-19, 1979.
 90. Galli M. And Trestiwani S. Benefits of a special cooling system to improve precision and accuracy in non-vaporizing on-column injection procedures, **J. Chromatogr.**, **203**, 193-205, 1981.
 91. Schomburg G., Husmann H. And Rittmann R. Direct (on-column) sampling into glass capillary column. Comparative investigations on split, splitless and on-column sampling, **J. Chromatogr.**, **204**, 85-96, 1981.
 92. Grob K. Gas Chromatographic stationary phases analyzed by capillary gas chromatography, **J. Chromatogr.**, **198**, 176-179, 1980.
 93. Eder K., Reichlmayr- Lais A.M and Kirchgessner M. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters: avoiding discrimination by PTV injection, **J. Chromatography**, **588**, 265-272, 1991.
 94. Badings H.T. and De Jong C. Capillary gas chromatography of fatty acid methyl esters. Study of conditions for the quantitative analysis for short- and long-chain fatty acids in lipids. **J. of Chromatogr.**, **279**, 493-506, 1983.
 95. Marbot R., González L. y Tápanes R. Influencia de la temperatura del inyector en las determinaciones cuantitativas por CGL., **Ciencia y Tecnología**, **11**, 45-52, 1987.
 96. Ulberth F. and Scharamel F. Accurate quantitation of short, medium, and long chain fatty acid methyl esters by split-injection capillary gas-liquid chromatography, **J. Chromatogr.**, **704**, 455-463, 1995.
 97. Marrero D., González L., González V.L., Laguna A. y González J.L., La técnica de inyección por *solvent-flush* en el análisis cuantitativo de ácidos grasos de muy elevada masa molecular por cromatografía gaseosa; **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **33**, 51-54, 2002.
 98. González V.L., Magraner J., Laguna A., Velázquez C. y Lorenzo M. Metodología analítica por Cromatografía Gaseosa para la determinación de los alcoholes alifáticos superiores que componen el policosanol, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **29**, 123-126, 1998.
 99. Sierra R., González V.L., Magraner J. y Cuellar A. Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación D002 en tabletas con dosis de 50 y 100 mg por Cromatografía Gaseosa, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **35**, 127, 2004.
 100. Marrero D., González V.L. y Méndez E., Metodología analítica para la determinación de los ácidos grasos que componen el D003 mediante cromatografía gaseosa con columna de relleno, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **37**, 19-20, 2006.
 101. Wiedemer R.T., Mckinley S.L. and Rendl T.W. Advantages of wide-bore capillary columns, **American Laboratory**, **1**, 1-6, 1986.
 102. Supelco Inc. GC Bulletin 814B. Wide Bore (0.53mm and 0,75 mm ID) High Efficiency and large sample capacity in packed column or capillary column gas chromatographs, 1-10, 1986.
 103. Giffin K.M. and Wilson W.H. Preparation and analysis of FAMES by automated esterification/capillary gas chromatography. Hewlett Packard Application Note, 288-357, 1-11, 1996.
 104. Ulberth F., and Henninger M. Determination of Fatty Acid Profile of Fish by One-Step Extraction/Methylation Method, **Fat. Sci. Technol.**, **97**, 77-80, 1995.
 105. García D.J. Omega-3 long-chain PUFA nutraceuticals, **Food Technol.**, **52**, 44-49, 1998.
 106. Ratnayake W.M.N., *et al.* Essential fatty acids and their trans geometrical isomers in powdered and liquid infant formulas sold in Canada, **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, **25**, 400-407, 1997.
 107. Adaki J., *et al.* Abnormality of very long-chain fatty acids of erythrocyte membrane in alcoholic patients. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, **22**, 103s-107s, 1998.
 108. Ackman R.G. Timmims A.M. and Shanta N.C. Letter to editor. Clarification on Method Ce-1b-89. **INFORM 1** (November): 987, 1990.

109. Elias V.O., Simoneit B.R.T., Pereira A., Cabral J.A. and Cardoso J.N. Detection of high molecular weight organic tracers in vegetation smoke samples by high-temperature gas chromatography-mass spectrometry, **Environ. Sci. Technol.** **33**, 2369-2376, 1999.
110. Ulbert F. and Gabering R. Quantitative aspects of triglyceride analysis by gas-liquid chromatography using a short metal capillary column. **J. of Chromatogr.**, **773**, 233-237, 1997.
111. Marrero D., Méndez E., González V., Tejeda Y. and Laguna A., Determination of D003 by capillary gas chromatography, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **33**, 99-105, 2002.
112. Ackman R.G. and Burgher R.D. Cod liver oil fatty acids as secondary reference standards in the GCL of polyunsaturated fatty acids of animal origin: analysis of a dermal oil of the Atlantic leatherback turtle, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **42**, 38-42, 1965.
113. Ackman R.G. Handbook of Chromatography (H.K. Mangold Ed.) Vol. 1, Lipids, CRC Press, Boca Raton, 95-240, 1984.
114. Ackman R.G. Gas liquid chromatography of fatty acids and esters, *Methods Enzymol.*, J.M. Lowenstein Ed., Academic Press, London, 14, 329, 1969.
115. Gasco L. Teoría y Práctica de la Cromatografía en fase gaseosa, Ediciones J.E.N., Madrid. Cap. 9, 305, 1969.
116. Dobson G. and Chirstie W.W. Structural analysis of fatty acids by mass spectrometry of picolinyl esters and dimethylloxazoline derivatives, **Trends in Analyt. Chem.**, **15**, 30-137, 1996
117. Crews P, Rodriguez J. and Jaspers M. (Eds) Organic Structure Analysis, Oxford University Press, United Kingdom, 1998.
118. Novák J. Quantitative Analysis by Gas Chromatography, Part 6 (J. Cazes Editor) 2nd Edn., 79-135. Marcel Dekker, New York, 1988.
119. Ettre L.S. Gas Chromatography, Academic Press, NY, 546-552, 1962.
120. Serra J., Estudio de la composición de la cera de abejas (*Apis mellifera* L.) española, *Grasas y Aceites*, **39**, 6, 334-342. 1988.
121. Saw Palmeto Monography, USP 26 NF21, 2003.
122. Grob K., Lanfranchi M. and Mariani C. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, sterols and their esters by coupled LC-GC, **JAOCS**, **67**, 626-634, 1990.
123. Katritzky A.R., Ignatchenko E.S., Barcock R.A., Lobanov V.S. and Karelson M. Prediction of gas-chromatographic retention times and response factors using a general quantitative-structure-property relationship treatment., **Anal. Chem.**, **66**, 1799-1807, 1994.
124. Jalali-Heravi M., Fatemi M.H. Prediction of flame ionization detector response factors using an artificial neural network, **J. Chromatogr., A**, **825**, 161-169, 1998.
125. Chaurasia Ch.S, Williams T.D., Judson Ch.M., Hanzlik R.P. Quantitation of Fatty Acids and Hidroxy Fatty Acids by GC/MS. Predictively Useful Correlations of Relative Response Factors with Empirical Formula. **J. Mass Spectrom.**, **30**, 1018-1022, 1995.
126. González L., Marrero D. and González J.L. Group method approach to the estimation of response factors of unavailable substances in quantitative gas chromatography. **J. Chromatography A**, **888**, 159-173, 2000.
127. Severson R.F., Ellington J.J., Arrendale R.F. and Snook M.E. Quantitative gas Chromatographic method for the analysis of aliphatic hydrocarbons, terpenes, fatty alcohols, fatty acids and sterols in tobacco, **J. of Chromromatogr.**, **160**, 155-168, 1978.
128. González V.L., Magraner J., Otero T. y García E. Validación y estudio de colaboración interlaboratorios de una nueva metodología analítica por CG para la determinación de policosanol en la materia prima, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **30**, 148-151, 1999.
129. González V.L. and Magraner J. Validation of a Gas Chromatographic method for determining the fatty alcohols that compose policosanol in 5 mg film-coated tablets, **J. AOAC Int.**, **82**, 834-839, 1999.
130. Sierra R., González V.L. and Magraner J. Validation of a gas chromatographic method for determination of fatty alcohols in 10 mg film-coated tablets of policosanol, **J. AOAC Int.**, **85**, 1-4, 2002.
131. Méndez E., Marrero D., Laguna A. and González V.L. , GC determination of long chain fatty acids that compose D003 in 5 mg film-coated tablets. **J. Pharm. and Biomed. Anal.**, **31**, 613-620, 2003.
132. Muskiet F.A. Capillary gas chromatographic profiling of total long-chain fatty acids and cholesterol in biological materials, **J. Chromatogr.**, **278**, 231-244, 1983.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

TECNOLOGIA DE APLICACION DE BUENAS PRACTICAS DE FABRICACION PARA LA OBTENCION DE UN BIONEMATICIDA

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

La agricultura actual demanda la reducción de plaguicidas químicos y la introducción de sistemas sustentables con el uso de agentes de control biológico. La mayoría de las industrias de controles biológicos de bajos insumos no cuentan con tecnologías efectivas de fabricación que garanticen productos seguros y eficaces. Un ejemplo de esto es que no existen normas de Buenas Prácticas de Fabricación para estas producciones.

La tecnología presentada se realizó a partir de la cepa IMI SD: 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. catenulata ACB de nemátodos formadores de agallas, producto deficitario en la práctica agrícola para el control de esta plaga. En ella se incluye el diseño de una guía de Buenas Prácticas de Fabricación, la creación de una metodología de implementación, la definición de un proceso productivo útil para otros hongos Agentes de Control Biológico y un sistema documental que permite la estabilidad de la producción.

Se lograron obtener 15 lotes en condiciones de planta piloto, con los indicadores de control de proceso y producto final que demostraron ser efectivos para el control de la plaga en cultivo de hortalizas.

Este aporte tecnológico puede ser utilizado por productores y organizaciones reguladoras, para la fabricación de otros bioplaguicidas microbianos. Estos resultados demostraron que tecnologías de bajos insumos en países en desarrollo, pueden obtener productos consistentes. La tecnología de producción y calidad ha sido transferida con éxito a países como México y Kenya.