

Desarrollo de un método analítico rápido para la determinación de los ácidos grasos de muy alto peso molecular presentes en el D003, materia prima

Ernesto Méndez Antolín, Yunaisy Jardines Leyva, David Marrero Delange y Víctor González Canavaciolo.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de febrero de 2003. Aceptado: 24 de octubre de 2003.

Palabras clave: ácidos grasos de muy alto peso molecular, determinación cuantitativa, método analítico rápido.
Key words: very long-chain fatty acids, quantitative determination, fast analytical method.

RESUMEN. El D003 es una mezcla de ácidos grasos saturados y lineales desde 24 a 36 átomos de carbono obtenida de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) con acción hipocolesterolemizante y antiagregante plaquetario. El presente estudio consiste en el desarrollo de un método analítico rápido para la determinación del contenido de ácidos grasos de muy alto peso molecular presentes en el D-003, materia prima. Para ello, los ácidos grasos de esta mezcla fueron derivatizados a sus ésteres metílicos en una fase constituida por ácido sulfúrico 2 % en metanol (v/v) y extraídos al mismo tiempo, en una segunda fase de n-hexano. El rendimiento máximo de la reacción se alcanzó a los 5 min. A partir de esta última fase, se extrajeron alícuotas que fueron analizadas por cromatografía de gases mediante el empleo de una columna DB-5 *wide bore*, usando ácido 1-nonadecanoico como patrón interno. Las muestras así obtenidas y conservadas a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ y $(70 \pm 5)\%$ de humedad relativa fueron estables durante 20 d. El empleo de la técnica de *solvent-flush* utilizando un disolvente volátil (acetona) permitió garantizar la mayor precisión en la determinación de los factores másicos de respuesta relativa, los que resultaron similares a los teóricos. La adición de agua durante la preparación de las muestras disminuyó la detección cromatográfica de los ésteres metílicos. Los resultados fueron similares a los obtenidos con otro método anteriormente validado con similar objetivo, si bien, el presente método mostró ventajas en la rapidez de la preparación de las muestras.

ABSTRACT. D-003 is a substance isolated from sugarcane wax consisting of a mixture of lineal and saturated very long-chain fatty acids from 24 to 36 atoms of carbon, obtained from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax with cholesterol-lowering and antiplatelet effects. The present study was undertaken to develop a rapid analytic method for determining the content of very long-chain fatty acids present in the raw material, in which the fatty acids were converted to their methyl esters using sulphuric acid at 2 % in methanol (v/v), and extracted in a second n-hexane phase. The maximum efficiency of the reaction was obtained at 5 min. Aliquots were taken from this last phase, being analysed by gas chromatography by using a DB-5 wide bore column and 1-nonadecanoic acid as internal standard. The samples thus prepared and kept to $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ and $(70 \pm 5)\%$ of relative humidity were stable for 20 d. The solvent-flush technique with acetone reached the most precise results in the determination of relative mass response factors, which were similar to the theoretical ones. The addition of water during sample preparation did not improve the specificity of the detection. The comparison of the results here presented with those obtained with a previous method developed and validated for the same purpose were similar, the present method showing advantages regarding the rapidity in the sample preparation.

INTRODUCCION

El D003 constituye una mezcla de ácidos grasos de alto peso molecular, aislada y purificada a partir de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum Officinarum* L.).¹ La producción de la materia prima de D003 a escala de planta ha mostrado una composición reproducible en los lotes producidos. Los ácidos mayoritarios son los de número par de átomos de carbono, entre los cuales, el ácido 1-otacosanoico se encuentra en mayor proporción.

El D-003 ha mostrado efectos hipolipemiente y antiagregante plaquetario en estudios experimentales y clínicos.²⁻⁸ Además, ha sido demostrado que el D-003 previene la peroxidación lipídica de las lipoproteínas plasmáticas.⁹ Estudios experimentales de toxicidad aguda, subcrónica y crónica han mostrado ausencia de toxicidad inducida por el producto,^{10,11} mientras que estudios de genotoxicidad y de sus efectos sobre la fertilidad y la reproducción tampoco han mostrado toxicidad atribuible a él.^{12,13}

La cromatografía de gases (CG) ha permitido estudiar gran cantidad de lípidos, dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos. Estos últimos para su estudio por CG son convertidos en derivados más volátiles, frecuentemente ésteres metílicos, aunque otros ésteres pueden ser utilizados con este fin.^{14,15} Los ésteres

metílicos pueden prepararse a través de transmetilación catalizada por un ácido o una base,¹⁶ mediante el uso del diazometano y reactivos relacionados,¹⁷ y otros procedimientos descritos.¹⁸ Los estudios publicados acerca de los modos de esterificación de los ácidos grasos con frecuencia cubren solamente desde el C₁₄ hasta el C₂₂, pudiéndose encontrar estos últimos en estado libre o enlazado a otros lípidos.

El control de la calidad y los estudios de estabilidad de la materia prima del D003 se realiza a través de un método analítico validado (técnica 1-PA),¹⁹ el cual permite cuantificar los ácidos grasos (C_{24:0}-C_{36:0}) que comprende esta mezcla. Si se tiene en cuenta que se trata de un método analítico aplicado al control de la calidad de una materia prima, este debe ser básicamente poco costoso y permitir obtener resultados lo más rápido posible. Sin embargo, la técnica 1-PA presenta el inconveniente de requerir mucho tiempo para alcanzar el rendimiento máximo de la reacción de esterificación de dichos ácidos, previo al análisis cromatográfico.

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar algunos aspectos de un nuevo método analítico (técnica 2-PA), que pretende ser alternativo al que se encuentra validado, en el cual los ácidos grasos libres del D003 son metilados en una fase compuesta por metanol con un 2 % de ácido sulfúrico (relación v/v) y al mismo tiempo, son extraídos en una segunda fase de n-hexano, la cual, al ser menos densa, queda en la parte superior, lo que facilita tomar con la jeringuilla microlítrica el volumen requerido para el análisis cromatográfico. Además, se investigó si la adición de agua durante la preparación para el análisis cromatográfico de las muestras, permite mejorar la precisión del método.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Cromatógrafo de gases modelo GC-14A (SHIMADZU, Japón) acoplado a computadora modelo C-R4A de la misma firma, provista de *software* para procesamiento de datos. La detección se realizó mediante un detector de ionización por llama y empleando una columna *wide bore* con fase enlazada DB-5 (30 m, 0,53 mm d.i. y 1,5 µm de espesor de película; J&W, USA). Programación: de 250 °C hasta 320 °C a 5 °C/min y 10 min isotérmico a la temperatura final. El flujo del gas portador fue de 11,4 mL/min.

Para la formación de la llama se empleó un flujo de hidrógeno y aire de 40 mL/min y 400 mL/min, respectivamente. La temperatura del inyector fue de 300 °C y la del detector de 320 °C. El volumen de inyección fue de 1 µL.

Cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrómetro de masas modelo MD 800 (FISON Instruments, Inglaterra) con un procesador de datos computadorizado. Se empleó una columna capilar SPB-5 (25 m, 0,25 mm, 0,5 µm; Supelco, USA). Programación: de 100 °C hasta 200 °C a 40 °C/min, de 200 °C hasta 320 °C a 10 °C/min y 10 min isotérmico a la temperatura final. El flujo del gas portador (helio) fue de 1 mL/min. La temperatura del inyector, la fuente y de la interfase fue de 300, 250 y 250 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV y se inyectó 1 µL de muestra.

Reactivos y disoluciones

Disolución de patrón interno (DPI): ácido 1-nonadecanoico (C_{19:0}, 99 % CG, Sigma, USA) en cloroformo (99 % CG, Riedel-de Haen, Alemania) 1,00 mg/mL.

Disolución de referencia de ácidos grasos (DRA): 1-tetracosanoico (C_{24:0}) 0,13 mg/mL; 1-pentacosanoico (C_{25:0}) 0,09 mg/mL; 1-hexacosanoico (C_{26:0}) 0,28 mg/mL; 1-heptacosanoico (C_{27:0}) 0,24 mg/mL; 1-octacosanoico (C_{28:0}) 2,91 mg/mL; 1-nonacosanoico (C_{29:0}) 0,16 mg/mL; 1-triacontanoico (C_{30:0}) 1,60 mg/mL y 1-hentriacontanoico (C_{31:0}) 0,10 mg/mL (todos > 99 %, Sigma, USA) en cloroformo (> 99 %, Riedel-de Haen, Alemania).

Producto: D003, lote 2 (Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba).

Disolución metilante (DM): 2 % de ácido sulfúrico (95-97 %, Merck, Alemania) en metanol (99,8 %, Merck, Alemania).

Disolución matriz de referencia (DMR): Se añadió 0,50 mL de la DRA y 0,25 mL de DPI a un vial; se llevó a sequedad en corriente de nitrógeno con calentamiento a 80 °C; se añadieron 0,5 mL de DM e igual cantidad de n-hexano (95 %, Riedel-De Haen, Alemania) y se calentó a 80 °C durante 5 min con agitación a intervalos. Posteriormente, se llevó a temperatura ambiente y se le añadió 0,05 mL de agua destilada. Después de 10 min, se inyectó en el equipo 1 µL de la fase de n-hexano.

Preparación de la muestra

Se pesaron 5 mg de la materia prima en un vial y se adicionaron 0,5 mL

de DPI y se llevó a sequedad con una corriente de nitrógeno seco. Se añadieron 0,5 mL de DM e igual cantidad de n-hexano y se calentó a 80 °C durante 5 min con agitación a intervalos. Posteriormente, se llevó a temperatura ambiente y se añadieron 0,05 mL de agua destilada. Después de 10 min, se inyectó 1 µL de la fase de n-hexano en el cromatógrafo de gases.

Método de análisis cualitativo

Como criterio de identificación se determinó la retención relativa de cada uno de los ácidos grasos que forman el D003, desde el C_{24:0} hasta el C_{36:0}, para lo cual, se tomó como referencia al patrón interno C_{19:0}. La retención relativa determinada se comparó con la obtenida del análisis de una muestra preparada a partir del lote 2, previamente estudiada por cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas.²⁰

Método de análisis cuantitativo

El porcentaje de cada ácido graso (C_i) presente en el producto se obtuvo por el método cuantitativo del patrón interno, mediante la ecuación siguiente:

$$C_i = \frac{A_i \cdot f_i^m \cdot m_{pi} \cdot 100 \%}{A_{pi} \cdot m_m}$$

donde:

A_i área bajo el pico cromatográfico del componente a analizar.

m_{pi} masa de patrón interno (mg).

A_{pi} área bajo el pico cromatográfico del patrón interno.

f_i^m factor másico de respuesta relativa.

m_m masa de la muestra (mg).

Los factores másicos de respuesta relativa se calcularon a partir del análisis cromatográfico de la DMR, según:

$$f_i^m = \frac{A_{pi} \cdot m_i}{A_{pi} \cdot m_{pi}}$$

donde:

m_i masa del componente a analizar.

Al no disponerse de patrones comerciales de los ácidos desde 32 hasta 36 átomos de carbono fue empleado, para los ácidos C_{32:0}, C_{34:0} y C_{36:0} el factor calculado para el ácido C_{30:0}, y para los ácidos C_{33:0} y C_{35:0} el del ácido C_{31:0}.

Evaluación del modo de inyección

Al analizar una serie homóloga de ácidos grasos de muy alto peso molecular (D003) empleando CG se

hace marcado el efecto discriminativo de la introducción de estos en la cámara de vaporización, lo que ocurre como consecuencia de las diferencias en las temperaturas de ebullición de los mencionados ácidos grasos. A medida que esta aumenta, las probabilidades de permanecer cierta cantidad del analito en la aguja de la jeringuilla en el momento de la inyección de la muestra aumentan también, lo cual provoca una disminución en la sensibilidad de las determinaciones. Con el objetivo de evaluar la incidencia del mencionado efecto discriminatorio en las condiciones cromatográficas empleadas, se realizó un primer estudio en el que se evaluaron tres modos de inyección usando una DMR. Se calculó para cada ácido el factor másico de respuesta relativa y la respuesta másica específica (R_i^m), esta última a través de la ecuación siguiente:

$$R_i^m = \frac{A_i}{m_i}$$

La DMR se analizó empleando la técnica de *solvent-flush* con acetona (condición 1) y con tolueno (condición 2). La selección de ambos disolventes se basó en que estos presentan una notable diferencia en sus respectivas temperaturas de ebullición. Dicha técnica se realizó empleando una jeringuilla microlítrica de 10 μ L (Hamilton, Suiza) mediante el procedimiento siguiente: se tomó disolvente puro hasta la marca de 0,2 μ L, después 0,2 μ L de aire, 1 μ L de muestra y finalmente, 0,2 μ L de aire. La tercera condición consistió en no utilizar dicha técnica, es decir, se tomó 1 μ L de muestra y se inyectó directamente en la cámara correspondiente. La operación se ejecutó cada vez con una penetración suave y una rápida introducción de la muestra. Cada condición se evaluó con cinco réplicas.

Evaluación cinética de la reacción de metilación

Con el objetivo de determinar el tiempo necesario para alcanzar el rendimiento máximo en la reacción de esterificación de los ácidos grasos del D003, se procedió según el acápite de preparación de las muestras, con la diferencia de que se evaluaron, además de los cinco minutos, 10, 30, 60 y 120 min (cinco réplicas para cada caso). Para precisar si había diferencias significativas en los resultados del porcentaje total de D003 en los cinco tiempos evaluados los resultados se analizaron mediante la

prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Además, se compararon los coeficientes de variación (CV) determinados para cada ácido y el total, con los CV permitidos por Horwitz. En estos últimos se tuvo en cuenta el porcentaje del analito en la muestra, por ejemplo, para aquellos que estuvieran en 0,1; 1; 10; 50 y 100 %, los CV permitidos serían 5,7; 4; 2,8; 2,2 y 2 %, respectivamente.²¹⁻²³

Estudio de estabilidad de las muestras preparadas

Con el objetivo de verificar la estabilidad de los ésteres metílicos en la fase n-hexano, se prepararon cinco muestras según fue previamente descrito. Alícuotas de estas muestras se analizaron el mismo día de preparadas y a los 20 d de conservadas a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ y $(70 \pm 5) \%$ de humedad relativa.

A través de una prueba F de Fisher y t de Student se comprobó la posible existencia de diferencias significativas entre las dispersiones y las medias entre los dos análisis.

Comparación entre las técnicas 1 y 2 PA en la determinación cuantitativa de los ácidos grasos presentes en el D003

A partir del lote 2 de D-003 (materia prima) se prepararon ocho muestras según fue descrito anteriormente para el presente método (técnica 2-PA) e igual cantidad de muestras por la técnica 1-PA previamente validada. Esto permitió comparar los resultados del contenido individual y total de ácidos de muy alto peso molecular de un lote, expresa-

do en porcentaje, mediante ambos métodos. Se evaluó la precisión en los resultados a través de los coeficientes de variabilidad, estos fueron comparados con los CV permitidos por Horwitz. Además, las pruebas F de Fisher y t de Student fueron empleadas para analizar las dispersiones y las medias de las dos técnicas, respectivamente.

Influencia de la adición de agua en la determinación de D003

Con el objetivo de conocer la influencia del agua se evaluó la adición de pequeñas cantidades de agua destilada después del paso de metilación de las muestras. Fueron preparados tres grupos de muestras a las que se les adicionaron 0,05; 0,1 y 0,2 mL de agua destilada y un último grupo al que no se le añadió esta. Se realizaron cinco réplicas en cada caso. Se determinó el porcentaje por ácido y total de todas las muestras; además, se calculó el CV global para cada ácido y el total en los tres grupos de muestras a los que se les añadió agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación del modo de inyección

Las condiciones cromatográficas empleadas resultaron apropiadas para la realización de las diferentes determinaciones (Fig. 1), ya que todos los picos de interés estuvieron resueltos. No se encontraron interferencias entre los ácidos grasos y el patrón interno. Como era de esperar, al emplear la técnica de *solvent-flush* con acetona y tolueno se obtuvieron los menores valores de CV en la de-

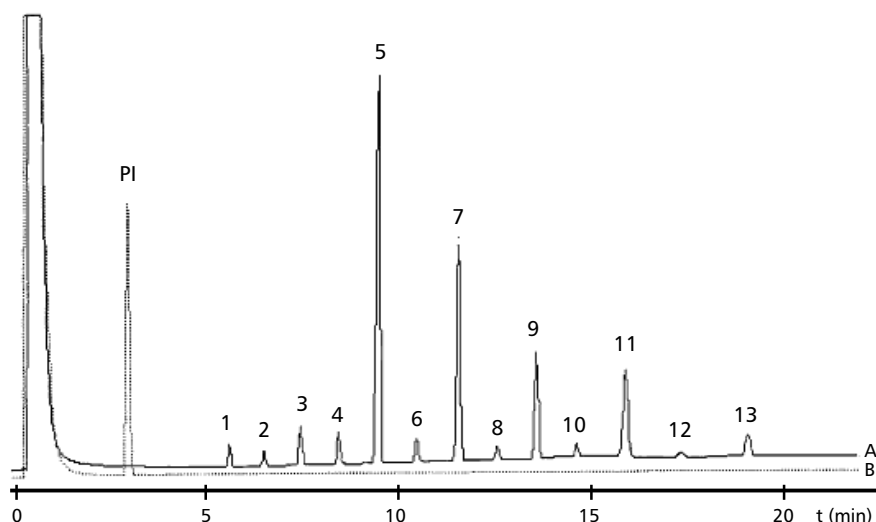


Fig. 1. Perfiles cromatográficos: (A) ácidos grasos presentes en las muestras de D003, (B) patrón interno; analizados como ésteres metílicos. Picos: PI ($C_{19:0}$), (1) $C_{24:0}$, (2) $C_{25:0}$, (3) $C_{26:0}$, (4) $C_{27:0}$, (5) $C_{28:0}$, (6) $C_{29:0}$, (7) $C_{30:0}$, (8) $C_{31:0}$, (9) $C_{32:0}$, (10) $C_{33:0}$, (11) $C_{34:0}$, (12) $C_{35:0}$ y (13) $C_{36:0}$.

terminación de los factores másicos de respuesta relativa (Tabla 1). En la condición 1, a diferencia de las demás, los resultados del cálculo del factor másico de respuesta relativa de los ocho ácidos grasos involucrados en el estudio fueron muy similares entre sí y respecto a los respectivos valores teóricos.²⁴ Esto quiere decir que en las condiciones cromatográficas empleadas, el *solvent-flush* con el disolvente más volátil (acetona) anuló el efecto discriminativo de la introducción de los ácidos grasos de muy elevada masa molecular en la cámara de vaporización. El uso de la acetona también permitió alcanzar los resultados más precisos.

La técnica de *solvent-flush* debió arrastrar mayor cantidad de analitos hacia el interior de la cámara de vaporización si se le compara con la inyección manual sin su empleo, sin embargo, esto no ocurrió, pues en las condiciones 1 y 2, la respuesta másica específica fue menor que en la condición 3 (Tabla 2). La respuesta a esta contradicción puede encontrarse en una combinación de dos factores: el volumen de expansión de los vapores del disolvente de la muestra y el empleo por la técnica y segundo, la presión que ejercen ambos disolventes en el momento de su vaporización puede exceder la que existe en el inyector. Estos dos factores pueden con frecuencia provocar cierto flujo de analitos hacia el exterior a través del septum o hacia los conductos del gas transportador, y por tanto, no son detectados. Esto no ocurrió o sencillamente resultó disminuido al emplearse sola-

mente el disolvente de la muestra, es decir, al no usar el *solvent-flush*.

Al emplear la acetona, la respuesta másica específica para todos los ácidos grasos fue menor que con el tolueno. Esto último se debió a que la acetona posee un mayor volumen de expansión, lo que provocó una mayor pérdida de la respuesta másica específica.

Evaluación cinética de la reacción de metilación

Los CV calculados para cada ácido graso después de tomar en consideración las 15 muestras involucradas en el estudio, estuvieron por debajo de los límites propuestos por Horwitz (Tabla 3). El porcentaje to-

tal de ácidos grasos obtenido en los diferentes tiempos evaluados no presentó diferencias significativas. Fueron suficientes 5 min para alcanzar el rendimiento máximo en la reacción de formación de los ésteres metílicos.

Estudio de estabilidad de las muestras preparadas

Teniendo en cuenta que el método se basa en la formación de dos fases perfectamente visibles, en la inferior, el metanol en medio ácido y en la superior, el n-hexano, era factible que ocurriesen cambios en los equilibrios de distribución de los ácidos grasos en el tiempo, por lo cual se evaluó la estabilidad de las

Tabla 2. Resultados de la determinación de la respuesta másica específica (R_i^m) para los ácidos contenidos en la DMR en los tres modos de inyección evaluados, *solvent-flush* con acetona (condición 1), *solvent-flush* con tolueno (condición 2) y sin emplear *solvent-flush* (condición 3).

Acido	Condición		
	1	2	3
	$R_i^m \pm DE$		
C24:0	41 535 $\pm$ 2425	44 381 $\pm$ 2343	55 502 $\pm$ 1312
C25:0	40 053 $\pm$ 2276	43 225 $\pm$ 2308	53 484 $\pm$ 1330
C26:0	40 342 $\pm$ 2409	44 313 $\pm$ 2514	52 401 $\pm$ 1321
C27:0	41 126 $\pm$ 2357	45 823 $\pm$ 2562	53 460 $\pm$ 1305
C28:0	41 478 $\pm$ 2200	46 620 $\pm$ 2697	52 415 $\pm$ 1318
C29:0	42 164 $\pm$ 2497	48 269 $\pm$ 2786	53 270 $\pm$ 1362
C30:0	41 107 $\pm$ 2274	47 131 $\pm$ 2776	51 066 $\pm$ 1201
C31:0	41 862 $\pm$ 2429	48 380 $\pm$ 2845	51 908 $\pm$ 1351
Promedio total	41 208 $\pm$ 719	46 018 $\pm$ 1915	52 938 $\pm$ 1330

C_{24:0} - C_{31:0} Patrones de ácidos grasos saturados entre 24 y 31 átomos de carbono.
 R_i^m Respuesta másica específica. DE Desviación estándar.

Tabla 1. Resultados de la determinación del factor másico de respuesta relativa (f_i^m) para los ácidos contenidos en la DMR en los tres modos de inyección evaluados, *solvent-flush* con acetona (condición 1), *solvent-flush* con tolueno (condición 2) y sin emplear *solvent-flush* (condición 3).

Acido	f_i^m teórico	Condición					
		1		2		3	
		$f_i^m \pm DE$	CV (%)	$f_i^m \pm DE$	CV (%)	$f_i^m \pm DE$	CV (%)
C24:0	0,969	0,957 $\pm$ 0,005	0,52	0,952 $\pm$ 0,010	1,05	1,081 $\pm$ 0,022	2,04
C25:0	0,964	0,992 $\pm$ 0,006	0,60	0,977 $\pm$ 0,012	1,23	1,122 $\pm$ 0,020	1,78
C26:0	0,960	0,985 $\pm$ 0,005	0,51	0,953 $\pm$ 0,015	1,57	1,145 $\pm$ 0,024	2,1
C27:0	0,956	0,966 $\pm$ 0,005	0,52	0,922 $\pm$ 0,015	1,63	1,122 $\pm$ 0,023	2,05
C28:0	0,953	0,958 $\pm$ 0,005	0,52	0,906 $\pm$ 0,015	1,66	1,144 $\pm$ 0,023	2,01
C29:0	0,949	0,943 $\pm$ 0,005	0,53	0,875 $\pm$ 0,015	1,71	1,126 $\pm$ 0,022	1,95
C30:0	0,946	0,967 $\pm$ 0,005	0,52	0,896 $\pm$ 0,015	1,67	1,175 $\pm$ 0,021	1,79
C31:0	0,943	0,949 $\pm$ 0,005	0,53	0,873 $\pm$ 0,015	1,76	1,156 $\pm$ 0,024	2,08

C_{24:0} - C_{31:0} Patrones de ácidos grasos saturados entre 24 y 31 átomos de carbono. f_i^m Factor másico de respuesta relativa. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

Tabla 3. Porcentajes obtenidos para cada ácido y el total después del análisis de las muestras preparadas con 5, 10, 30, 60 y 120 min de reacción de metilación.

Acido	Tiempo (min)					Media $\pm$ DE	CV (%)
	5	10	30	60	120		
C24:0	1,3	1,29	1,29	1,31	1,24	1,29 $\pm$ 0,027	2,10
C25:0	0,98	0,97	0,98	0,99	0,94	0,97 $\pm$ 0,019	1,98
C26:0	2,67	2,69	2,65	2,7	2,62	2,67 $\pm$ 0,032	1,20
C27:0	2,18	2,21	2,16	2,18	2,22	2,19 $\pm$ 0,024	1,12
C28:0	29,35	29,67	29,02	29,6	29,49	29,43 $\pm$ 0,257	0,87
C29:0	1,51	1,52	1,49	1,52	1,58	1,52 $\pm$ 0,034	2,21
C30:0	15,99	16,25	15,79	16,17	16,27	16,09 $\pm$ 0,203	1,26
C31:0	0,99	1,04	0,98	1,01	1,06	1,02 $\pm$ 0,034	3,31
C32:0	8,17	8,32	8,02	8,26	8,2	8,19 $\pm$ 0,113	1,38
C33:0	1,17	1,17	1,20	1,16	1,16	1,17 $\pm$ 0,016	1,40
C34:0	9,75	9,9	9,53	9,85	9,64	9,73 $\pm$ 0,151	1,56
C35:0	0,52	0,54	0,54	0,56	0,55	0,54 $\pm$ 0,015	2,74
C36:0	3,28	3,39	3,31	3,46	3,34	3,36 $\pm$ 0,071	2,11
Total	77,88	78,95	76,90	78,78	78,33	78,17 $\pm$ 0,822	1,05

C_{24:0}-C_{36:0} Ácidos grasos saturados entre 24 y 36 átomos de carbono. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

muestras en esas condiciones durante un tiempo dos veces superior al tiempo máximo utilizado en la práctica para guardar las muestras de análisis. La tabla 4 muestra que los CV de los porcentajes para cada ácido y el total de estos, cuando las determinaciones se realizaron el mismo día de preparadas las muestras

(t_0) y después de 20 d (t_1), se encontraron por debajo de los límites propuestos por Horwitz. Lo mismo sucedió con el CV global, donde se tuvieron en cuenta todas las muestras involucradas en el estudio.

Las pruebas F de Fisher y t de Student comprobaron que no hay diferencias significativas entre las

dispersiones y las medias obtenidas para los porcentajes totales a t_0 y t_1 , ya que los valores experimentales de F (1,31) y t (0,140) fueron menores que los tabulados 9,60 (0,05; 4; 4) y 2,306 (0,05; 8), respectivamente.

Comparación entre las técnicas 1 y 2 PA en la determinación cuantitativa de los ácidos grasos presentes en el producto

Al calcular independientemente los CV en las determinaciones para cada ácido y para el total de ácidos por cada técnica, solamente el ácido minoritario C_{33:0} en la técnica 1-PA fue superior al límite propuesto por Horwitz (Tabla 5).

El CV global para cada ácido estuvo por debajo de los mencionados límites, con excepción de los ácidos C_{33:0} y C_{35:0}. Debido al carácter minoritario de estos últimos en el D-003, no se afectó la precisión de la determinación del total de los ácidos, ya que el CV global (1,18 %) fue inferior al límite permitido por Horwitz (2 %).

Al realizar las pruebas F de Fisher y t de Student se comprobó que no existieron diferencias significativas entre las dispersiones y las medias obtenidas por ambas técnicas para el total de ácidos, ya que los valores experimentales de F (1,29) y t (0,817) fueron inferiores a los tabulados 3,79 (0,05; 7; 7) y 2,145 (0,05; 14), respectivamente.

Para lograr un rendimiento máximo en la reacción de formación de los ésteres metílicos por la técnica

Tabla 4. Resultados de la determinación de D003 el día de preparadas las muestras (t_0) y después de 20 d (t_1).

Acido	t_0		t_1		CV global (%)
	P $\pm$ DE	CV (%)	P $\pm$ DE	CV (%)	
C24:0	1,24 $\pm$ 0,016	1,29	1,23 $\pm$ 0,022	1,79	1,56
C25:0	0,97 $\pm$ 0,011	1,13	0,97 $\pm$ 0,015	1,55	1,29
C26:0	2,62 $\pm$ 0,041	1,56	2,59 $\pm$ 0,056	2,16	1,85
C27:0	2,26 $\pm$ 0,044	1,95	2,23 $\pm$ 0,053	2,38	2,12
C28:0	29,14 $\pm$ 0,451	1,55	29,19 $\pm$ 0,689	2,36	1,88
C29:0	1,55 $\pm$ 0,036	2,33	1,58 $\pm$ 0,028	1,77	2,09
C30:0	16,05 $\pm$ 0,274	1,71	16,06 $\pm$ 0,345	2,15	1,83
C31:0	1,01 $\pm$ 0,023	2,28	1,03 $\pm$ 0,007	0,68	1,73
C32:0	8,17 $\pm$ 0,151	1,84	8,1 $\pm$ 0,129	1,59	1,69
C33:0	1,16 $\pm$ 0,016	1,38	1,17 $\pm$ 0,018	1,54	1,39
C34:0	9,7 $\pm$ 0,182	1,87	9,57 $\pm$ 0,124	1,30	1,68
C35:0	0,54 $\pm$ 0,015	2,78	0,54 $\pm$ 0,01	1,85	2,79
C36:0	3,33 $\pm$ 0,081	2,43	3,33 $\pm$ 0,047	1,41	1,87
Total	77,76 $\pm$ 1,228	1,58	77,61 $\pm$ 1,407	1,81	1,60

C_{24:0}-C_{36:0} Ácidos grasos saturados entre 24 y 36 átomos de carbono. P Porcentaje promedio. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación. CV global Coeficiente de variación teniendo en cuenta los dos grupos de muestras.

Tabla 5. Comparación estadística entre las técnicas 1-PA (n = 8) y 2-PA (n = 8) en cuanto a la determinación de los ácidos grasos presentes en el D003.

Acido	Técnica 1-PA		Técnica 2-PA		CV global (%)
	P ± DE	CV (%)	P ± DE	CV (%)	
C24:0	1,24 ± 0,017	1,4	1,25 ± 0,026	2,11	1,89
C25:0	0,92 ± 0,021	2,28	0,964 ± 0,010	1,09	2,80
C26:0	2,53 ± 0,017	0,65	2,62 ± 0,035	1,36	1,36
C27:0	2,24 ± 0,036	1,64	2,21 ± 0,04	1,82	1,84
C28:0	28,59 ± 0,282	0,98	29,13 ± 0,321	1,10	1,40
C29:0	1,52 ± 0,022	1,43	1,54 ± 0,028	1,85	1,73
C30:0	15,94 ± 0,165	1,04	16,01 ± 0,194	1,21	1,11
C31:0	0,99 ± 0,014	1,47	1,01 ± 0,018	1,84	1,86
C32:0	8,21 ± 0,105	1,28	8,15 ± 0,124	1,52	1,41
C33:0	1,24 ± 0,049	3,95*	1,16 ± 0,017	1,48	4,61*
C34:0	9,55 ± 0,126	1,32	9,71 ± 0,178	1,83	1,79
C35:0	0,51 ± 0,020	3,83	0,54 ± 0,015	2,82	4,25*
C36:0	3,28 ± 0,063	1,92	3,35 ± 0,067	2,01	2,18
Total	76,76 ± 0,771	1,00	77,63 ± 0,879	1,13	1,18

C_{24:0} - C_{36:0} Ácidos grasos saturados entre 24 y 36 átomos de carbono. P Porcentaje promedio. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación. CV global Coeficiente de variación teniendo en cuenta los dos grupos de muestras. * Valores por encima de los límites de aceptación.

Tabla 6. Evaluación de la adición de agua en la determinación del D003. El CV global está referido solamente a los resultados del análisis de las muestras a las que se le adicionó agua en su preparación.

Acido	Volumen añadido de agua (mL)				CV global (%)
	0	0,05	0,1	0,2	
	P ± DE				
C24:0	1,27 ± 0,100	1,16 ± 0,027	1,18 ± 0,039	1,17 ± 0,016	2,3
C25:0	0,97 ± 0,112	0,92 ± 0,017	0,93 ± 0,031	0,91 ± 0,037	2,97
C26:0	2,81 ± 0,099	2,51 ± 0,034	2,55 ± 0,073	2,51 ± 0,044	1,97
C27:0	2,44 ± 0,091	2,16 ± 0,024	2,17 ± 0,044	2,13 ± 0,032	1,65
C28:0	32,72 ± 1,20	28,85 ± 0,049	28,66 ± 0,496	28,32 ± 0,303	1,56
C29:0	1,77 ± 0,150	1,56 ± 0,04	1,57 ± 0,038	1,54 ± 0,014	2,02
C30:0	18,50 ± 0,980	16,12 ± 0,029	16 ± 0,209	15,82 ± 0,145	1,44
C31:0	1,20 ± 0,080	1,06 ± 0,027	1,04 ± 0,011	1,029 ± 0,008	1,92
C32:0	9,54 ± 0,800	8,27 ± 0,211	8,22 ± 0,074	8,13 ± 0,067	1,4
C33:0	1,39 ± 0,077	1,23 ± 0,014	1,21 ± 0,013	1,19 ± 0,016	3,3*
C34:0	11,44 ± 0,502	10,05 ± 0,061	9,85 ± 0,050	9,73 ± 0,079	1,47
C35:0	0,66 ± 0,04	0,54 ± 0,008	0,55 ± 0,009	0,56 ± 0,009	5,48*
C36:0	4,01 ± 0,23	3,45 ± 0,088	3,48 ± 0,026	3,48 ± 0,04	1,5
Total	88,72 ± 4,050	77,73 ± 1,143	77,41 ± 1,06	76,49 ± 0,604	1,3

C_{24:0} - C_{36:0} Ácidos grasos saturados entre 24 y 36 átomos de carbono. P Porcentaje promedio. DE Desviación estándar. CV global Coeficiente de variación teniendo en cuenta las muestras a las que se les adicionó agua. * Valores por encima de los límites de aceptación.

2-PA se necesitaron solamente 5 min, lo que permitió que la preparación de las muestras fuera más rápida que en la técnica previamente validada,

pues en esta última se requieren 90 min para esta reacción. Teniendo en cuenta esta ventaja y que no se detectaron diferencias significativas

en la determinación de los ácidos grasos de muy alto peso molecular presentes en la materia prima de D003 mediante el empleo de ambos métodos, se concluye que el presente método parece aventajar el anterior, si bien una conclusión definitiva requiere de su ulterior validación.

Influencia de la adición de agua en la determinación de D003

Se observó que los tres grupos de muestras a los que se les añadió agua en su preparación presentaron diferencias en los resultados del porcentaje determinado para cada ácido y el total al compararlos con el grupo al que no se le añadió el agua (Tabla 6). Esto demuestra que el agua, al cambiar la polaridad de la fase formada por la DM, influye en el equilibrio de distribución de los ácidos grasos hacia una u otra fase. Los resultados obtenidos mediante la adición de 0,05; 0,1 y 0,2 mL de agua destilada a las muestras no presentaron diferencias significativas en el porcentaje determinado para cada ácido, con excepción del C_{33:0} y C_{35:0} que presentaron CV superiores a los de Horwitz. No obstante, debido a su baja proporción en el producto estos últimos no influyeron en el CV global para el total de ácidos (1,3 %), el cual fue inferior al límite (2,0 %). Estos resultados demostraron que al añadir agua destilada durante la preparación de las muestras se mejoró la precisión de los resultados, ya que como se puede observar en la tabla 6, la desviación estándar de la determinación del porcentaje total de ácidos de las muestras a las que no se le añadió agua fue mayor que aquellas a las que se añadió esta.

El objetivo de la adición de agua en la preparación de las muestras es que esta aumente la polaridad de la DM, provocando que el equilibrio de distribución de los ácidos grasos del D003 se desplace en una mayor proporción hacia la fase n-hexano, lo que permite que disminuyan los límites de detección de los ácidos grasos en el análisis cromatográfico. Esto último se impone en los métodos analíticos de control de la calidad, especialmente al analizar muestras representativas de las primeras etapas de obtención de las materias primas, en las que los analitos de interés generalmente se encuentran en bajas proporciones.

Sin embargo, la respuesta neta (R_n) obtenida en el análisis de las muestras a las que se le añadió agua destilada fue inferior a la de aque-

llas sin agua añadida (Tabla 7). Teniendo en cuenta este resultado, se realizó un análisis de la pérdida ocurrida en la respuesta neta (PR) para cada ácido graso al añadir agua a través de la siguiente ecuación:

$$PR = 100 - \left(\frac{R_{n1}}{R_{n2}} \cdot 100 \right)$$

donde:

R_{n1} respuesta neta del ácido graso en la muestra a la que se le añadió el agua.

R_{n2} respuesta neta del ácido graso en la muestra a la que no se le añadió el agua.

La pérdida ocurrida en la respuesta neta (PR) para cada ácido graso parece estar relacionada con dos factores. Por una parte, una pequeña fracción de n-hexano que inicialmente era miscible con la DM, se separó de esta última al añadirse el agua, diluyendo en mayor grado los componentes de interés. La tabla 7 por su parte, muestra resultados que sustentan la contribución de otro factor. Como se aprecia, a partir del ácido $C_{28:0}$ los valores promedios de PR se mantuvieron similares, por lo que otra razón de la reducción de la respuesta parece relacionarse con que la mayoría de los ácidos grasos presentes en el D003 antes de la adición del agua se encuentran en pro-

porción insignificante en la fase DM como consecuencia del largo de la cadena hidrocarbonada de estos ácidos grasos que los hace muy apolares, permitiendo que el equilibrio de distribución sin la adición de agua se encuentre desplazado casi totalmente hacia la fase n-hexano. Así, la causa de que los porcentajes obtenidos en el grupo de muestras a las que no se les adicionó agua destilada en su preparación fueran superiores respecto a las demás muestras radica, en que en las primeras el patrón interno se encuentra en una menor concentración en la fase de n-hexano.

Estos resultados indican que la adición de agua a las muestras es desventajosa para lograr el objetivo pretendido de mejorar la detección, ya que originó una disminución en la respuesta cromatográfica de los analitos de interés, sin embargo, su empleo permitió alcanzar resultados más precisos al compararlos con los de las muestras preparadas sin la adición del agua.

CONCLUSIONES

La técnica de *solvent-flush* empleando la acetona mejora la precisión en la determinación de los factores másicos de respuesta relativa y permite obtener valores similares a los teóricos, anulando el efecto discriminativo frecuentemente observado en el análisis de los ácidos

grasos de muy alto peso molecular por cromatografía gaseosa.

El estudio demostró la precaución que se debe tener en la selección del disolvente para ejecutar la técnica de inyección de *solvent-flush*, pues su volumen de expansión provoca una pérdida en la respuesta de los analitos de interés.

Para lograr un rendimiento máximo en la reacción de formación de los ésteres metílicos por la técnica 2-PA se necesitan solamente 5 min, lo que permite que la preparación de las muestras sea más rápida que en la técnica previamente validada, pues en esta última se requieren 90 min para esta reacción. Teniendo en cuenta esta ventaja y que no se detectan diferencias significativas en la determinación de los ácidos grasos de muy alto peso molecular presentes en la materia prima de D003 mediante el empleo de ambos métodos, se concluye que el presente método parece aventajar al anterior, si bien una conclusión definitiva requiere de su ulterior validación.

En las muestras preparadas mediante la técnica 2-PA, los ésteres metílicos formados demostraron ser estables en la fase n-hexano durante 20 d a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ y $(70 \pm 5) \%$ de humedad relativa.

La adición de agua como un paso en la preparación de las muestras

Tabla 7. Análisis de la respuesta neta promedio (R_n) y la pérdida de respuesta promedio (PR) para los ácidos del D003 en el ensayo de la adición de agua.

Acido	Volumen añadido de agua (mL)					
	0		0,05		0,1	
	Rn		Rn	PR (%)	Rn	PR (%)
C19:0	40 343		38 091	7,63	37 266	7,63
C24:0	5 165		4 446	13,93	4 474	13,38
C25:0	3 985		3 533	11,35	3 521	11,65
C26:0	11 055		9 291	15,96	9 359	15,35
C27:0	9 899		8 272	16,44	8 311	16,05
C28:0	132 858		110 456	16,87	109 254	17,47
C29:0	7 373		6 111	17,12	6 069	17,69
C30:0	7 511		61 687	17,88	61 012	18,51
C31:0	4 896		4 077	16,73	4 021	16,65
C32:0	38 721		31 637	18,3	31 442	18,8
C33:0	5 683		4 728	16,81	4 718	16,99
C34:0	46 400		37 924	18,27	37 679	18,8
C35:0	2 685		5 159	19,6	2 167	19,3
C36:0	16 248		13 194	18,8	13 307	18,11

$C_{24:0}$ - $C_{36:0}$ Ácidos grasos saturados entre 24 y 36 átomos de carbono. R_n Respuesta neta. PR Pérdida de respuesta.

por el método alternativo, lejos de aumentar la detección de los ácidos grasos del D003 esterificados, provoca una pérdida en la respuesta cromatográfica.

BIBLIOGRAFIA

- González L., Marrero D., Laguna A., Más R., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Cora M., Menéndez R. (Laboratorios DALMER S.A.). Mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax, Patent CU 22,723; USA 6,486, 205, 1997.
- Gómez R., Mendoza S., Más R., Mesa R., Castaño G., Marrero D. Dose-dependent cholesterol-lowering effects of D003 on normocholesterolaemic rabbits. *Curr. Ther. Res.*, **61**, 460-468, 2000.
- Menéndez R., Más R., Marrero D., Amor A., Rodeiro I., Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D003, a mixture of very long-chain saturated fatty acids, *Atherosclerosis (special issue)*, **151**, 131, 2000.
- Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Valdés S., Antiplatelet and antithrombotic effects of D003. *Pharmacol. Res.*, **42**, 137-143, 2000.
- Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Synergistic effect of D003 and aspirin on experimental thrombosis models. *Prost., Leuk. and Essential fatty Acids.*, **68**, 305-310, 2003.
- Castaño G., Más R., Fernández L.; Assessment of D-003 a new antiplatelet and lipid-lowering compound, in healthy volunteers. *Drug Res. & Develop.*, **3**, 337-348, 2002.
- Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Molina V., Castaño G. and Gámez R., Effects of D-003, a new compound purified from sugarcane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers: A randomised, double-blinded study. *Clin. Drug Inv.*, **23**, 107-118, 2003.
- Castaño G., Menéndez R., Más R., Ledón N., Fernández J.C., Pérez J.L., González R.M. and Lescay M.; A new hypocholesterolaemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. *Clin. Drug Inv.*, **23**, 193-203, 2003.
- Menéndez R., Más R. and Amor M.; Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long-chain saturated fatty acids. *Can. J., Physiol. Pharmacol.*, **80**, 13-21, 2002.
- Gómez R., Más R., Noa M., Menéndez R., Alemán C., Acosta C.P., García H., Hernández C., Amor M., Pérez J. and Goicochea E., Acute and oral subchronic toxicity of D003 in rats. *Toxicol. Lett.*, **118**, 31-41, 2000.
- Gómez R., Más R., Noa M., Menéndez R., García H., González J.E., Pérez Y. and Goicochea E.; Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. *Drug R D.*, **36**, 375-86, 2002.
- Gómez R., González J.E., Rodeiro I., Fernández I., Alemán C., Rodríguez M.D., Acosta C. and García H. *In vivo* genotoxic evaluation of D-003, a mixture of very long-chain aliphatic acids. *J. of Med. Food*, **4**, 85-91, 2001.
- Rodríguez M., Gómez R., González J., García H., Acosta C., Goicochea E. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long-chain fatty acids in rats. *Fd. Chem. Toxicol.*, **41**, 89-93, 2003.
- Iverson J.L. and Shepard A.J. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **60**, 284, 1977.
- Jensen N.J. and Gross M.L. *Mass Spectrom. Rev.*, **6**, 497, 1987.
- Christie W.W., in Gas chromatography and lipids-A practical Guide, (W.W. Christie Ed.), The Oily Press, Ayr, (Scotland), 66-70, 1989.
- Graff G., R.T. *Chem. Phys. Lipids*, **53**, 27-36, 1990.
- Robb, E.W. and Westbrook J.J., *Anal. Chem.*, **35**, 1644-1647, 1963.
- Marrero D., Méndez E., González V., Cora M., Laguna A., Granja, Determinación de D003 por Cromatografía gaseosa, *Revista CENIC Ciencias Químicas*, **33**, 99-105, 2002.
- Méndez E., Marrero D., Gonzalez V. y Laguna A., GC determination of long chain fatty acids that compose D003 in 5-film-coated tablets. *J. of Pharm. and Biomed. Anal.*, **31**, 613-620, 2003.
- Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J. and Vicente L., Validation of analytical methods, Spanish Association of the Industry Pharmacists, Catalan Section, edited under HP license, 31, 1989.
- Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *J. AOAC*, **65**, 525-530, 1982.
- Christie W.W. Gas chromatographic analysis of fatty acids methyl esters with high precision. *Lipid Technol.*, **3**, 97-98, 1991.
- Ackman R.G., Gas Liquid chromatography of fatty acids and esters, *Methods Enzymol.*, J. M. Lowenstein Ed., Academic Press London, 14, 329, 1969.



SCIENTIA ET CONSCIENTIA



CONVOCATORIA

5. CONGRESO INTERNACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR "UNIVERSIDAD 2006"

"La universidad por un mundo mejor"

La Habana, Cuba, del 13 al 17 de febrero del año 2006.

El Ministerio de Educación Superior y las Universidades de la República de Cuba convocan a la comunidad de profesores, estudiantes, directivos y otras personas vinculadas a nuestro sector, al 5. Congreso Internacional de Educación Superior "Universidad 2006".

Desde el primer encuentro desarrollado en el año 1998, nuestros Congresos se han afirmado como un espacio reflexivo, profundo, comprometido y plural, orientado a la discusión de los más variados temas vinculados a la agenda internacional sobre Educación Superior. Será un placer y un privilegio encontrarnos de nuevo en el año 2006.

Contactos: Dr. Silvio J. Montalvo Martínez
Dr. Andrés García Martínez

Secretarios Ejecutivos, Universidad 2006, Telefax: (537) 8311613. Email: univ2006@reduniv.edu.cu