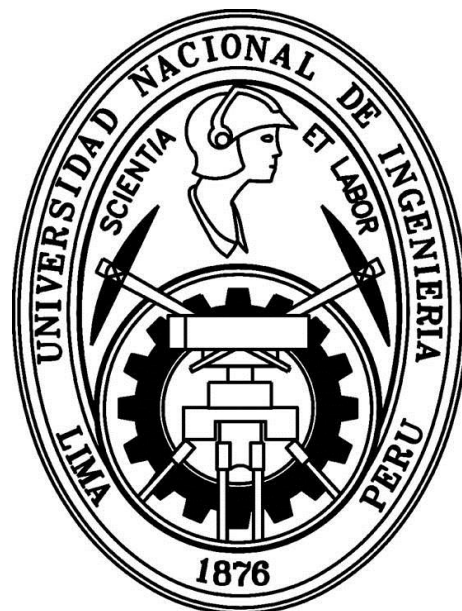


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**TESIS**

**“IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR CROMATOGRFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL  
CAROTENOIDE *All-trans-β-caroteno* EN LA MICROALGA *Arthrospira platensis*”**

**PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE**

**LICENCIADO EN QUÍMICA**

**ELABORADO POR**

**Anthony Ruiz Soto**

**ASESOR**

**Mg. Ily Marilú Maza Mejía**

**LIMA – PERÚ**

**2017**

## **DEDICATORIA**

A mis padres: Nilo y Maritza

Por su apoyo, esfuerzo y amor incondicional durante mi formación en el ámbito personal y profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Carla Aguilar Samanamud por la confianza y oportunidad de pertenecer al grupo del Laboratorio de Biotecnología Acuática del Instituto del Mar del Perú.

A Leenin Flores Ramos - Jefe de laboratorio de Análisis Instrumental y todo el equipo del Laboratorio de Biotecnología Acuática del IMARPE por la confianza y apoyo brindado para la realización de la Tesis.

A la profesora Ily M. Maza Mejía por su asesoría y observaciones durante la redacción de la Tesis.

A todos los profesores de la Escuela Profesional de Química por brindarme su guía y sabiduría en todo el periodo de estudios que me permitieron crecer en el ámbito personal y profesional.

Un especial agradecimiento para mis padres y hermanos por todo el apoyo, comprensión y motivación para seguir adelante en mi vida profesional.

## RESUMEN

La industria alimentaria emplea cada vez más los carotenoides por su capacidad de incrementar el valor nutritivo y otorgar color a los productos, en particular el  $\beta$ -caroteno es el pigmento más común en la familia de los carotenoides y es ampliamente utilizado en la producción de golosinas, helados, lácteos, bebidas y alimentos procesados debido a sus propiedades antioxidantes y ser precursor de la vitamina A.

Por lo tanto, el presente trabajo pretende cuantificar el contenido del carotenoide *All-trans*- $\beta$ -caroteno validando una metodología propuesta por Van Heukelem & Thomas aplicada en biomasa liofilizada de la microalga *Arthorspira platensis* por cromatografía líquida de alta resolución. Así, brindar una metodología alternativa para la determinación del carotenoide *All-trans*- $\beta$ -caroteno que se vienen desarrollando en diferentes laboratorios de análisis químico pertenecientes a la industria alimentaria, debido a que a nivel nacional no existen muchos estudios sobre el cultivo de la microalga *Arthorspira platensis*.

Las pruebas de validación se desarrollaron en un Cromatógrafo líquido con detector de arreglo de diodos HPLC-DAD dentro de las instalaciones del Laboratorio de Análisis Instrumental, el carotenoide estudiado fue el *All-trans*- $\beta$ -caroteno y se identificó comparando su espectro de absorción UV y tiempo de retención con un estándar certificado de *All-trans*- $\beta$ -caroteno obteniendo una concentración promedio de 831  $\mu\text{g}$  de *All-trans*- $\beta$ -caroteno por gramo de muestra.

Los parámetros de validación estudiados fueron; la linealidad, donde se reportó un coeficiente de correlación ( $r$ ) mayor a 0,995; en el estudio de repetibilidad y precisión intermedia valores porcentuales de desviación estándar relativa menores al 1,5% y 2,5%, un porcentaje de recuperación entre 90% y 105%, los límites de detección y cuantificación fueron 1,96  $\mu\text{g/mL}$  y 6,49  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y el estudio de la robustez demostró que el método analítico tuvo mayor sensibilidad al cambio de la temperatura de la columna, longitud de onda y exposición a luz respecto al resto de factores evaluados. Además se estimó la incertidumbre del método revisando diferentes fuentes bibliográficas como la EURACHEM



y por experiencia del analista, identificando las principales fuentes de incertidumbre y sus respectivas contribuciones.

El método ha cumplido con los criterios de aceptación propuestos según normas vigentes como la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Asociación de las Comunidades Analíticas (AOAC Internacional), el Codex Alimentarius, Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), ICH, ISO y se le ha considerado como una buena alternativa para la cuantificación del carotenoide *All-trans-β-caroteno* en la microalga *Arthorspira platensis*.

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENERALIDADES</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. <i>Arthrospira platensis</i> (<i>Spirulina platensis</i>)</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.1. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.2. Descripción</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1.3. Composición Química</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1.4. Obtención de biomasa microalgal</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2. CAROTENOIDES</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.1. Definición</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.2. Clasificación</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.3. <math>\beta</math>-Caroteno</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.4. Estudios del <math>\beta</math>-Caroteno como antioxidante</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.5. Determinación de <math>\beta</math>-Caroteno</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3. El <math>\beta</math>-CAROTENO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4.1. Definición</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4.2. Etapas de la validación de un método analítico</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5. TIPOS DE VALIDACIONES DE MÉTODOS DE ENSAYO</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5.1. Validación Prospectiva</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5.2. Validación Concurrente</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5.3. Validación Retrospectiva</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5.4. Revalidación</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6. PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.1. Veracidad</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.2. Precisión</b> .....	<b>23</b>

2.6.3. Linealidad .....	24
2.6.4. Sensibilidad.....	26
2.6.5. Límite de Detección (LOD).....	27
2.6.6. Límite de Cuantificación (LOQ).....	28
2.6.7. Selectividad .....	28
2.6.8. Robustez .....	28
2.6.9. Incertidumbre.....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. MATERIALES.....	34
4.1.1. Muestra .....	34
4.1.2. Reactivos .....	34
4.1.3. Equipo .....	34
4.1.4. Materiales de laboratorio .....	35
4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	35
4.2.1. Preparación de los estándares.....	35
4.2.2. Extracción del All- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno en la microalga <i>Arthorspira platensis</i> .....	35
4.2.3. Condiciones del Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC.....	36
4.2.4. Metodología de la Validación .....	36
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>40</b>
5.1. PRUEBA DE NORMALIDAD .....	40
5.2 SELECTIVIDAD .....	43
5.2.1. Interferentes en el pico del estándar interno (IS) .....	43
5.2.2. Identificación de los picos cromatográficos .....	44
5.2.2. Resolución de los picos.....	45

<b>5.3. LINEALIDAD .....</b>	<b>49</b>
<b>Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ) .....</b>	<b>52</b>
<b>5.4. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>5.5. PRECISIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>5.6.1 Precisión a condiciones de repetibilidad .....</b>	<b>54</b>
<b>5.6.2 Precisión Intermedia .....</b>	<b>56</b>
<b>5.6. ROBUSTEZ .....</b>	<b>59</b>
<b>5.7 INCERTIDUMBRE DEL ANÁLISIS .....</b>	<b>61</b>
<b>5.7.1. Modelo matemático .....</b>	<b>61</b>
<b>5.7.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre .....</b>	<b>62</b>
<b>5.7.3. Evaluación de las fuentes de incertidumbre <math>u_{(xi)}</math> .....</b>	<b>63</b>
<b>5.7.3.1. Incertidumbre debido al pesaje de la muestra <i>Arthrospira platensis</i> (m).....</b>	<b>63</b>
<b>5.7.3.2. Incertidumbre del Volumen usado (V) .....</b>	<b>67</b>
<b>5.7.3.3. Incertidumbre estándar de la curva de calibración (Co) .....</b>	<b>69</b>
<b>5.7.3.4. Incertidumbre de la repetibilidad .....</b>	<b>70</b>
<b>5.7.3.5. Incertidumbre de la Recuperación.....</b>	<b>71</b>
<b>5.7.4. Evaluación de la incertidumbre estándar combinada .....</b>	<b>72</b>
<b>5.7.5. Estimación de la incertidumbre expandida <math>U_e</math>.....</b>	<b>74</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>GLOSARIO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO A: Extracción de carotenoides Método de Van Heukelem &amp; Thomas.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO B: Prueba de valores atípicos.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO C: Cromatogramas típicos de la validación.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO D: Certificados de análisis y calibración.....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO E: Fotografías.....</b>	<b>123</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 2.1.</b> Fotografías tomadas de un cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> por el Banco de Germoplasma. ....	5
<b>Figura 2.2.</b> Cultivo de la microalga <i>Arthrospira platensis</i> en matraces de 1 L.....	7
<b>Figura 2.3.</b> Cultivo intermedio y masivo de la microalga <i>Arthrospira platensis</i> .....	8
<b>Figura 2.4.</b> Cosecha de la microalga <i>Arthrospira platensis</i> por filtración con malla de 45 $\mu\text{m}$ .....	9
<b>Figura 2.5.</b> Secado de biomasa de la microalga <i>Arthrospira platensis</i> .....	9
<b>Figura 2.6.</b> Posible esquema para la degradación de carotenoides .....	11
<b>Figura 2.7.</b> Propiedad de Homocedasticidad. Distribución homocedástica (Izquierda), distribución heterocedástica (Derecha) .....	26
<b>Figura 5.1.</b> Gráfico de probabilidad de las relaciones de Áreas usando el software Minitab 16.....	41
<b>Figura 5.2.</b> Comparación de cromatogramas de la muestra con estándar interno (Muestra_con_IS) y la muestra sin estándar interno (Muestra_sin_IS) .....	43
<b>Figura 5.3.</b> Pico cromatográfico de la muestra con estándar interno (Muestra_con_IS) y sin estándar interno (Muestra_sin_IS) .....	44
<b>Figura 5.4.</b> Espectro de absorción UV del carotenoide All- <i>trans</i> - $\beta$ -Caroteno presente en la microalga <i>Arthrospira platensis</i> (izquierdo) y espectro de absorción UV del carotenoide <i>all-trans</i> - $\beta$ - <i>caroteno</i> presente en el estándar (derecho). ....	45
<b>Figura 5.5.</b> Espectro de absorción UV del pico cromatográfico (1).....	46
<b>Figura 5.6.</b> Cromatograma típico obtenido en las pruebas de validación y los tiempos de retención.....	48
<b>Figura 5.7.</b> Curva de calibración para la determinación de la linealidad de la metodología analítica para la cuantificación del carotenoide <i>all-trans</i> $\beta$ -caroteno .....	49
<b>Figura 5.8.</b> Gráfico de residuales de la curva de calibración. ....	52
<b>Figura 5.9.</b> Efecto de los parámetros en el método analítico .....	60
<b>Figura 5.10.</b> Fuentes de incertidumbre en la determinación del carotenoide All- <i>trans</i> - $\beta$ -Caroteno en la muestra de <i>Arthrospira platensis</i> .....	62
<b>Figura 5.11.</b> Contribuciones de incertidumbre del método analítico .....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 2.1.</b> Composición nutricional de <i>Arthrospira platensis</i> comercial en polvo .....	6
<b>Tabla 2.2.</b> Estructuras de algunos carotenoides más distribuidos en la naturaleza .....	12
<b>Tabla 2.3.</b> Estructura del $\beta$ -Caroteno y sus 4 principales isómeros <i>cis</i> .....	13
<b>Tabla 2.4.</b> Prueba de robustez de Youden y Steiner.....	29
<b>Tabla 4.1.</b> Condiciones instrumentales del sistema cromatográfico.....	36
<b>Tabla 4.2.</b> Criterio de aceptación para el valor de Resolución .....	37
<b>Tabla 4.3.</b> Construcción de la curva de calibración del estándar.....	38
<b>Tabla 4.4.</b> Diseño factorial de Youden-Steiner .....	39
<b>Tabla 5.1.</b> Valores de la relación de áreas del All- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno y el estándar interno <i>trans</i> - $\beta$ -Apo-8'-carotenal de las 31 réplicas de la muestra para la prueba de normalidad....	40
<b>Tabla 5.2.</b> Valores del estadístico Anderson Darling. Prueba de Normalidad. ....	42
<b>Tabla 5.3.</b> Valores típicos de tiempo de retención, resolución de los picos y ancho de pico obtenidos en la prueba de validación.....	47
<b>Tabla 5.4.</b> Resultados obtenidos del ensayo de linealidad para para la cuantificación del carotenoide all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno. ....	49
<b>Tabla 5.5.</b> Características de la curva de calibración para el análisis de la linealidad del método .....	50
<b>Tabla 5.6.</b> Valores de la relación de áreas y varianzas de la prueba de homocedasticidad.	51
<b>Tabla 5.7.</b> Valores de límite de detección, cuantificación y sensibilidad.....	52
<b>Tabla 5.8.</b> Valores del porcentaje de recuperación del método analítico. ....	53
<b>Tabla 5.9.</b> Resultados de la precisión a condiciones de repetibilidad de la respuesta del equipo .....	55
<b>Tabla 5.10.</b> Resultados de la precisión a condiciones de repetibilidad del método analítico .....	55

<b>Tabla 5.11.</b> Valores de precisión intermedia del método .....	57
<b>Tabla 5.12.</b> Valores de Varianza de repetibilidad, entre laboratorios y de precisión intermedia .....	58
<b>Tabla 5.13.</b> Valores obtenidos según la metodología de Youden-Steiner .....	59
<b>Tabla 5.14.</b> Resumen de los efectos por cada parámetro y su valor crítico ( $2S$ ) .....	60
<b>Tabla 5.15.</b> Repetibilidad del pesaje del peso patrón de 10 g .....	65
<b>Tabla 5.16.</b> Repetibilidad del pesaje del matraz volumétrico de 250 mL .....	68
<b>Tabla 5.17.</b> Resultados de la curva de calibración obtenida en la prueba de validación .....	70
<b>Tabla 5.18.</b> Valores de la determinación de <i>All-trans</i> - $\beta$ -caroteno en la microalga <i>Arthrospira platensis</i> y sus incertidumbres .....	72
<b>Tabla 5.19.</b> Coeficientes de sensibilidad de las magnitudes de entrada y su contribución .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AEAS</b>	Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento
<b>AEFI</b>	Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria
<b>AOAC</b>	Official Methods of Analysis
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BIPM</b>	Oficina Internacional de Pesas y Medidas)
<b>COVENIN</b>	Comisión Venezolana de Normas Industriales
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>GUM</b>	Guide to the expression of uncertainty in measurement
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>ICH</b>	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
<b>INACAL</b>	Instituto Nacional de Calidad
<b>IS</b>	Estándar interno
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>KOH</b>	Hidróxido de Potasio
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>NATA</b>	National Association of Testing Authorities
<b>NMKL</b>	Nordic Committee on Food Analysis
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>ppm</b>	Partes por millón ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina



# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

---

Actualmente las microalgas han sido ampliamente estudiadas por sus numerosos contenidos de compuestos bioactivos, que son aprovechados para su uso comercial en la industria alimentaria, por ejemplo la microalga *Haematococcus pluvialis* para la producción de Astaxantina como potente antioxidante de importancia en la salud humana, la microalga *Schizochytrium* sp. para la producción de ácido docosahexaenoico (DHA) perteneciente al Omega-3 de gran importancia para la formación de los componentes estructurales del cerebro, etc. (Priyadarshani & Rath, 2012)

En particular el uso de la microalga *Arthrospira platensis* o también llamado “*Spirulina platensis*” como fuente alimenticia, se remonta a partir del siglo 9 y se cree que fue utilizado por los aztecas en México alrededor del siglo 16. Este microorganismo fue aislado por primera vez por Turpin en el año de 1827 en un arroyo de agua fresca y se han encontrado diferentes especies de *Spirulina* en ambientes como tierra, arena, agua de mar y agua fresca. (Mercola, 2011).

En el año 1970 algunos estudios realizados sobre el cultivo de microalgas se llevaron a cabo en los países con vías de desarrollo, varios proyectos en Perú, Tailandia e India fueron apoyados por la Agencia Alemana de Cooperación Técnica (GTZ), donde el objetivo de los estudios eran la producción de microalgas para el consumo humano, otros proyectos con el uso de *Spirulina* se llevaron a cabo en la India, Togo y Senegal. El objetivo principal de estos proyectos era desarrollar la producción de *Spirulina* por su alto contenido de  $\beta$ -caroteno (Provitamina A) y proteínas para ayudar a combatir la desnutrición en las personas que viven en pueblos de países subdesarrollados. (Giraldo Vicente, 2004).

La *Arthrospira platensis* se desarrolla en forma natural en diferentes lugares, siendo sus principales localizaciones en lagos de África (Kenia, Etiopía, Egipto, Sudán, Argelia, Congo, Zaire y Zambia). Se encuentra además en Asia tropical y subtropical (India, Myanmar,

Pakistán, Sri Lanka, China, Tailandia y Rusia), en América (Perú, Uruguay, California) y en Europa (España, Francia, Hungría y Azerbaijón) (Ramirez Moreno & Olvera Ramirez, 2006).

Actualmente, esta microalga rica en compuestos bioactivos está siendo utilizada en todo el mundo como suplemento alimenticio y vitamínico debido a su alto contenido de carotenoides ( $\beta$ -caroteno) y por sus aspectos farmacéuticos debido a sus propiedades antioxidantes para ayudar a tratar numerosas enfermedades del corazón, cáncer, etc.

El  $\beta$ -caroteno es un constituyente común en la *Spirulina platensis* presentando una concentración promedio del 1% (w/w), este compuesto incrementa la respuesta inmune en seres humanos y animales, además es convertido en vitamina A (Retinol) en el cuerpo humano, por lo que se conoce como Provitamina A. El consumo de  $\beta$ -caroteno es importante para la salud debido a que disminuye el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, protege la piel, fortalece el sistema inmunológico, protege la vista, previene la diabetes, etc. La protección contra el cáncer ha sido atribuida a su actividad antioxidante, siendo uno de los principales carotenoides implicados en el sistema de defensa contra los radicales libres (Ramirez Moreno & Olvera Ramirez, 2006).

Ante esta necesidad de cuantificar el  $\beta$ -caroteno (Provitamina A) se han desarrollado diversas técnicas, entre ellas la espectrofotometría UV y cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplada a diversos detectores tales como el arreglo de diodos DAD y UV-VIS (Perez Hernandez, Aldana J, & Rodriguez, 2011). Otros estudios utilizan métodos más sofisticados como técnicas acopladas a espectrometría de masas tales como cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC/MS) lo cual implica contar con una infraestructura adecuada y equipos muy costosos (Huck, Popp, Scherz, & Bonn, 2000).

Van Heukelem & Thomas reportaron una metodología alternativa que permite determinar el contenido de pigmentos, entre ellos el  $\beta$ -caroteno en muestras biológicas, este método presenta una serie de ventajas en las que destacan: menor toxicidad, fácil adaptación de análisis y menor costo, a comparación de otros métodos convencionales que utilizan solventes de extracción de mayor toxicidad como diclorometano, cloroformo, éter de

petróleo y requieren de largos tiempos de corrida con fases móviles de diferentes valores de pH que deterioran la columna cromatográfica.

De acuerdo a normas vigentes, las metodologías no normalizadas deben ser validadas (Resolución N° 0008-2003/INDECOPI-CRT), por ello, la Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI), Asociación de las Comunidades Analíticas (AOAC Internacional), Eurachem, el Codex Alimentarius, Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), ISO y otros organismos internacionales, recomiendan la validación del método analítico evaluando los parámetros de desempeño como: veracidad, precisión, especificidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad y robustez (Ruiloba Rossel, 2003).

En el presente trabajo, el método propuesto por Van Heukelem & Thomas ha sido aplicado con la finalidad de obtener una nueva alternativa para la cuantificación del carotenoide *All-trans-β-caroteno* en la microalga *Arthrospira platensis*, y permitir determinar que bajo condiciones de laboratorio el método cumple con los criterios de aceptación propuestos; prosiguiendo con las investigaciones relacionadas al estudio de biocompuestos en diferentes microalgas.

## CAPÍTULO 2: GENERALIDADES

---

### 2.1. *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*)

#### 2.1.1. Introducción:

La *Arthrospira platensis* llamado también "*Spirulina platensis*" debido a su apariencia en forma espiral filamentosa, es una microalga unicelular verde azulada del género de cianobacterias y pertenece a la clase Cyanophyceae de la familia Oscillatoriaceae (Kargin Yilmaz, 2012).

Esta microalga crece de forma natural en lagos alcalinos, que contienen bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) o carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y otros minerales, estos lagos se encuentran en todos los continentes incluyendo la Antártida, por ejemplo en América del Sur, crece en la laguna Orovilca, laguna Huacachina (Perú), lago Texcoco Cráter (México) y otros (Giraldo Vicente, 2004).

La *Arthrospira platensis* se cultiva en diferentes medios líquidos y sólidos llamados medios de cultivo, tales como: Negrita medio basal, BG11, Zarrouk, y modificado Zarrouk. La *Arthrospira platensis* está influenciada por las condiciones de cultivo, tales como: concentración de nitrógeno, la intensidad de la luz, presencia de contaminantes, la temperatura, la presencia de iones de bicarbonato, la concentración de fosfato y la concentración inicial de biomasa (El-Shouny, El-Fatah, El-Fatah Abomohra, & Abo-Eleneen, 2015).

La *Arthrospira platensis* se ha utilizado como complemento alimenticio durante siglos por diferentes poblaciones y redescubierto en los últimos años, la *Arthrospira platensis* es rica en nutrientes importantes, tales como proteínas (50-70%), vitaminas, minerales, carbohidratos y ácidos grasos esenciales como el ácido gamma linolénico (El-Shouny, El-Fatah, El-Fatah Abomohra, & Abo-Eleneen, 2015).

La vitamina B12 y el contenido de  $\beta$ -caroteno en la *Arthrospira platensis* es mayor que en cualquier otra planta en nuestro planeta; además la microalga compensa la deficiencia de vitaminas y minerales, promueve la fuerza, resistencia, y eleva la concentración de oxígeno en la sangre (USA GMP, 2016).

Además de su importancia nutricional, tiene aspectos de importancia medicinal debido a su eficacia en la reducción de la hiperlipidemia, la diabetes, la hipertensión arterial, y también se ha demostrado que posee efectos anti-virales y anti-cáncer (El-Shouny, El-Fatah, El-Fatah Abomohra, & Abo-Eleneen, 2015).

### 2.1.2. Descripción:

La Cyanophyta o algas azul-verdes incluyen a las plantas más primitivas, al igual que las bacterias tienen una organización procariota y carecen de cromatóforos como lo tienen otras algas o plantas superiores. Su coloración azul-verde predominante se debe principalmente a la clorofila a y a pigmentos como el  $\beta$ -caroteno, C-ficocianina (azul), C-ficoeritrina (rojo) y diversas xantofilas (Giraldo Vicente, 2004).

La *Arthrospira platensis* es una cianobacteria y tiene forma espiral, puede llegar a medir desde 0,3-1,0 milímetros (Eartrise Nutritional, 2016), bajo el microscopio aparece como filamentos verdosos de células cilíndricas dispuestas en filas helicoidales y deslizándose sobre su axil (Buttori & Di Ruscio, 2009).



Figura 2.1. Fotografías tomadas de un cultivo de *Arthrospira platensis* por el Banco de Germoplasma

### 2.1.3. Composición Química:

La composición química de las microalgas varían en magnitud de acuerdo a las condiciones de crecimiento como la temperatura, pH, la disponibilidad de nutrientes, etc (Giraldo Vicente, 2004).

La composición química de la microalga *Arthrospira platensis* se resume en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Composición nutricional de *Arthrospira platensis* comercial en polvo (Falquet, 2012)

<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>CONTENIDO (por g de peso seco)</b>
Carbohidratos	15 –25%
Proteínas	50 –70%
Lípidos	5,6 –7%
Ácidos nucleicos	4,2 –6%
<b>VITAMINAS</b>	
β-caroteno	700 –1700 µg
Vitamina E	50 – 190 µg
Vitamina B1(Thiamina)	34 – 50 µg
Vitamina B2	30 – 46 µg
Vitamina B6 (Piridoxina)	5 – 8 µg
Vitamina B12	1,5 – 2 µg
<b>MINERALES</b>	
Calcio	1300 – 1400 µg
Fósforo	6700 – 9000 µg
Hierro	580 – 1800 µg
Magnesio	2000 – 2900 µg
Potasio	6400 – 15400 µg
Sodio	4500 µg

#### **2.1.4. Obtención de biomasa microalgal:**

La biomasa es obtenida generalmente en un proceso que involucra 3 etapas: cultivo, cosecha y secado.

##### **2.1.4.1. Cultivo de microalgas.**

Este proceso se realiza en dos etapas:

La primera etapa consiste en cultivar la microalga a partir de matraces de 1 L bajo condiciones controladas en la Sala de microalgas (Temperatura ambiental 18°C y 100 lux de iluminación).



Figura 2.2. Cultivo de la microalga *Arthrospira platensis* en matraces de 1L

La segunda etapa consiste en elevar el volumen de manera escalonada (desde 2 L hasta 30 L, comenzando desde matraces y culminando en bolsas verticales de 30 L de capacidad)



Figura 2.3. Cultivo intermedio y masivo de la microalga *Arthrospira platensis*

**2.1.4.2. Cosecha de microalgas.** Culminando los días de cultivo se realiza la cosecha microalgal (acumulación de biomasa mediante la técnica de filtración), el cual es realizado con la ayuda de un tamiz de 45  $\mu\text{m}$ .





Figura 2.4. Cosecha de la microalga *Arthrospira platensis* por filtración con malla de 45 µm.

**2.1.4.3. Secado de biomasa microalgal.** El proceso de secado se puede realizar de diferentes métodos, pero para asegurar que la composición de la biomasa no se altere se prefiere liofilizar la biomasa húmeda.



Figura 2.5. Secado de biomasa de la microalga *Arthrospira platensis*. A la izquierda, se muestra el liofilizador usado (LABCONCO 16L) para liofilizar las muestras de biomasa microalgal. A la derecha, se muestran la biomasa liofilizada y conservado en bolsas ziploc a 4°C.

## 2.2. CAROTENOIDES

### 2.2.1. Definición:

Los carotenoides son compuestos activos biológicamente, clasificados como nutrientes con diversas aplicaciones terapéuticas. Poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenos (Perez Hernandez, Aldana J, & Rodriguez, 2011).

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides que son sintetizados por plantas, algas, levaduras, hongos, bacterias fotosintéticas y contienen 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranyl-pirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo ( $\beta$ -caroteno) y el rojo (licopeno) (Martínez Martínez, 2003).

Se han identificado más de 600 pigmentos naturales liposolubles que han atraído a muchos investigadores, debido a sus propiedades comercialmente deseables, tales como su origen natural, toxicidad nula y alta versatilidad (Strati, Sinanoglou, Kora, Miniadis Meimaroglou, & Oreopoulou, 2012). Entre los carotenoides tenemos el  $\beta$ -caroteno considerado como el carotenoide más importante comercialmente y ampliamente utilizado, el cual juega un rol importante tanto en el reino animal como en el vegetal, cumpliendo funciones tales como: secuestrador de especies reactivas de oxígeno, provitamina A, transferencia de energía en el proceso de fotosíntesis, entre otros.

Los carotenoides son compuestos sensibles a la luz, el calor, condiciones de pH y es propenso a la isomerización y oxidación, debido al gran número de dobles enlaces que posee su estructura, esto resulta en alguna manera la pérdida de color. (Yeverino Gutierrez, 1997)

La degradación oxidativa, es la principal causa de grandes pérdidas de carotenoides, depende de la disponibilidad de oxígeno y es estimulado por la luz, enzimas, metales, y co-oxidación con hidroperóxidos lipídicos (Rodriguez Amaya, 2001).

La formación de epóxidos y apocarotenoides (carotenoides con esqueleto de carbono abreviado) parece ser el paso inicial, como se muestra en la Figura 2.2 (Rodriguez & Kimura, 2004).

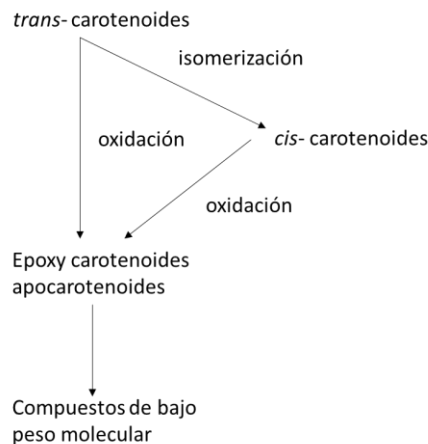


Figura 2.6. Posible esquema para la degradación de carotenoides (Rodríguez & Kimura, 2004).

La oxidación puede reducirse inyectando nitrógeno a la mezcla o mediante la adición de hielo seco previo a la homogeneización. Estas medidas, sin embargo, aumentan el costo de análisis, sin embargo el empleo de acetona fría y rápida extracción son suficientes para evitar errores en este paso (Rodríguez & Kimura, 2004).

Se han desarrollado diversas técnicas para la determinación de carotenoides, entre ellas la espectrofotometría UV y cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplada a diversos detectores tales como arreglo de diodos DAD, UV-VIS y masas. (Perez Hernandez, Aldana J, & Rodríguez, 2011).

### 2.2.2. Clasificación:

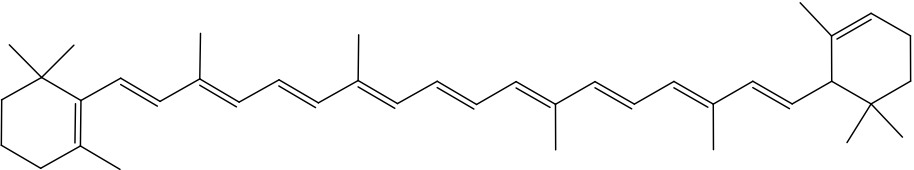
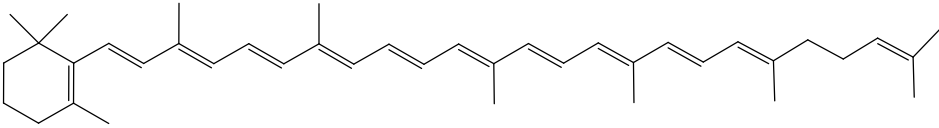
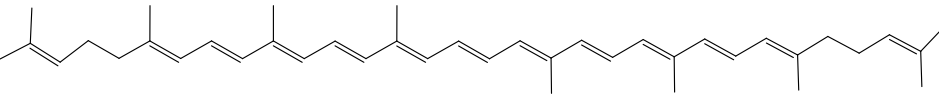
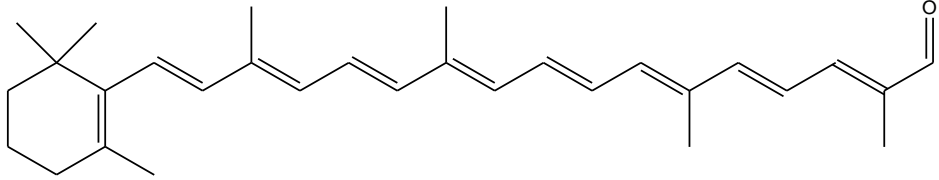
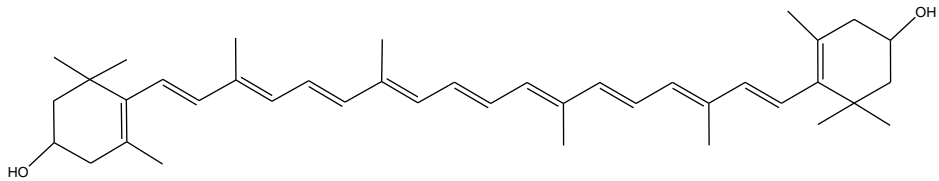
Los carotenoides se clasifican en dos grupos: Carotenos y Xantofilas.

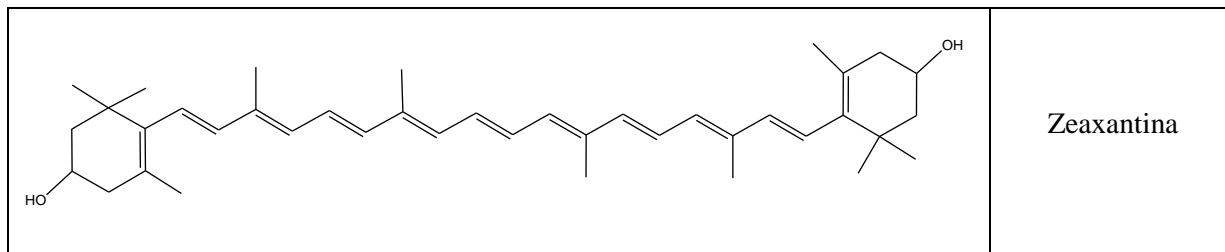
**2.2.2.1. Carotenos:** Los carotenos son compuestos químicos que solo contienen átomos de carbono e hidrógeno en su estructura, por lo que tienen características de hidrocarburos y son solubles en solventes apolares y poco polares como el éter de petróleo, tetrahidrofurano, etc., entre ellos encontramos al  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, licopeno, etc (Yeverino Gutierrez, 1997).

**2.2.2.2. Xantofilas:** Compuestos químicos pertenecientes al grupo de los carotenoides que posee uno o más átomos de oxígeno debido a que son la forma oxidada de los carotenoides, y se presentan como aldehídos, ácidos, alcoholes y ésteres que son solubles en solventes

polares como el metanol, entre ellas tenemos a la luteína, zeaxantina, fucoxantina, violaxantina, etc (Martínez Martínez, 2003). En general para los carotenos se usa el sufijo caroteno, y para las xantofilas el sufijo ina.

Tabla 2.2. Estructuras de algunos carotenoides más distribuidos en la naturaleza

<b>CAROTENOS</b>	
	$\alpha$ -caroteno
	$\gamma$ -caroteno
	Licopeno
<b>XANTOFILAS</b>	
	<i>trans</i> - $\beta$ -apo-8-carotenal
	Luteína



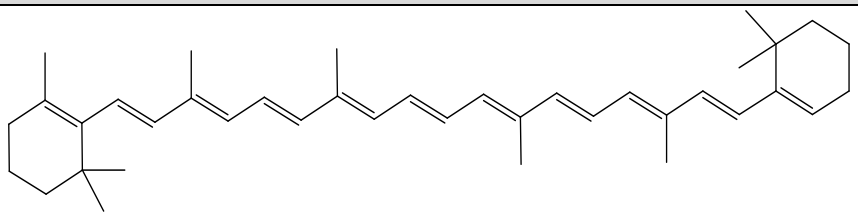
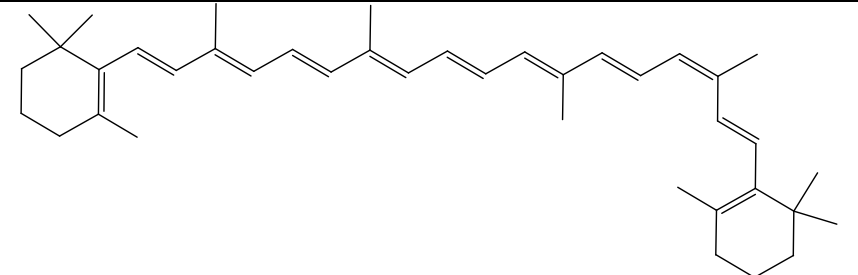
### 2.2.3. $\beta$ -Caroteno:

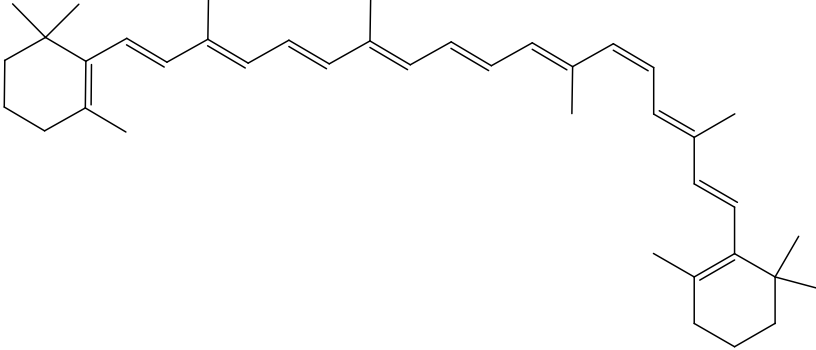
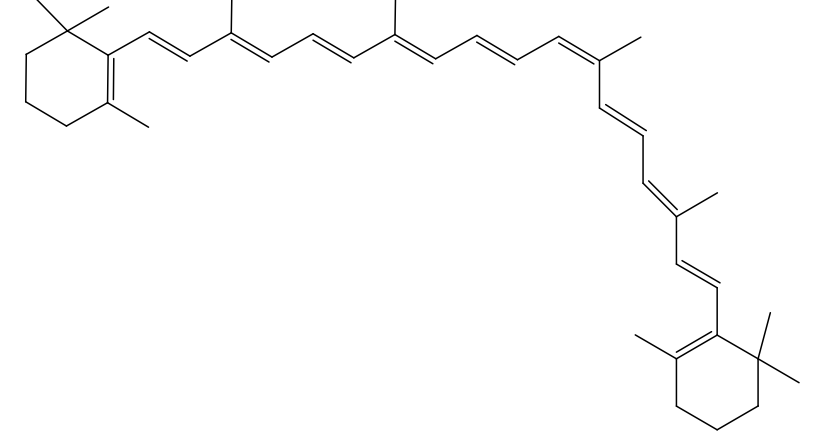
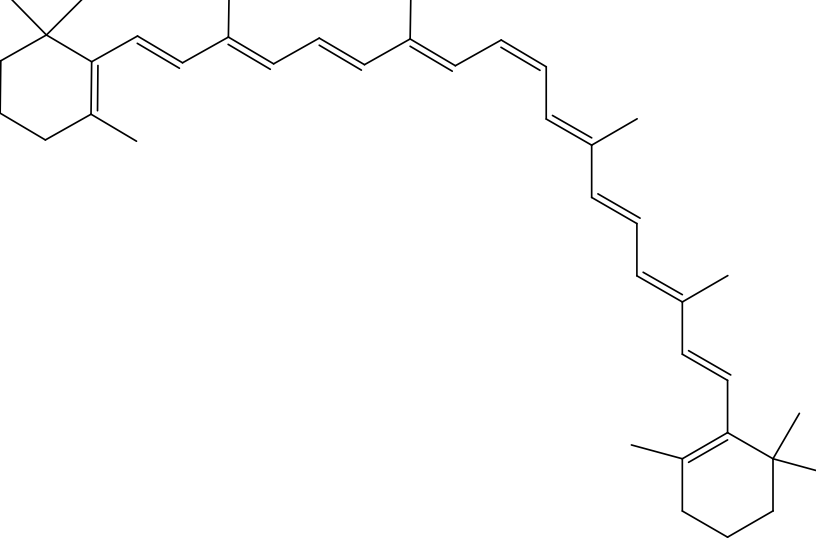
El  $\beta$ -caroteno es un pigmento de color naranja-amarillo de la familia de los carotenoides que se utiliza ampliamente como colorante de alimentos. El  $\beta$ -caroteno es muy atractivo como colorante alimentario natural debido a sus actividades antioxidantes y provitamina A que proporcionan un valor adicional a los productos (Wang, Lin, & Chen, 2012).

El  $\beta$ -caroteno fue el primer carotenoide purificado, su abundancia en vegetales y en alimentos hacen de él una fuente fundamental de vitamina A para muchas personas. Los carotenoides representan alrededor del 30% de la ingesta total de vitamina A. (Orozco Chilel, 2010)

La mayor parte de  $\beta$ -caroteno está naturalmente presente en la forma *trans* (All-*trans*- $\beta$ -Caroteno), sin embargo algunas cantidades de forma *cis* también están presentes en alimentos: 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, 11-*cis*- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno y 15-*cis*- $\beta$ -caroteno (ver Tabla 2.3) (Xu Qun & Rohrer, 2012).

Tabla 2.3. Estructura del  $\beta$ -Caroteno y sus 4 principales isómeros *cis*

<b>ESTRUCTURAS DEL <math>\beta</math>-CAROTENO Y SUS PRINCIPALES ISÓMEROS <i>cis</i></b>	
	<i>All-trans</i> - $\beta$ -caroteno
	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno

 <p>The structure shows a long polyene chain with 11 conjugated double bonds. The 11th double bond is in the cis configuration, while the other double bonds are in the trans configuration. The chain is terminated at both ends by a substituted cyclohexene ring with two methyl groups.</p>	<p>11-cis-<math>\beta</math>-caroteno</p>
 <p>The structure shows a long polyene chain with 13 conjugated double bonds. The 13th double bond is in the cis configuration, while the other double bonds are in the trans configuration. The chain is terminated at both ends by a substituted cyclohexene ring with two methyl groups.</p>	<p>13-cis-<math>\beta</math>-caroteno</p>
 <p>The structure shows a long polyene chain with 15 conjugated double bonds. The 15th double bond is in the cis configuration, while the other double bonds are in the trans configuration. The chain is terminated at both ends by a substituted cyclohexene ring with two methyl groups.</p>	<p>15-cis-<math>\beta</math>-caroteno</p>

#### **2.2.4. Estudios del $\beta$ -Caroteno como antioxidante:**

El  $\beta$ -caroteno es un pigmento de color amarillo o naranja que al ser ingerido se transforman en el hígado y en el intestino delgado en vitamina A (Orozco Chilel, 2010).

Presenta actividad antioxidante e inmunomodulación, que pueden prevenir enfermedades degenerativas, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes y varios tipos de cáncer, especialmente de próstata y tumores en el tracto digestivo (Strati, Sinanoglou, Kora, Miniadis Meimaroglou, & Oreopoulou, 2012).

Además se ha demostrado que previene la aparición de enfermedades del corazón por sus propiedades antioxidantes que contribuyen a que se formen menos depósitos en las arterias favoreciendo la circulación de la sangre (Orozco Chilel, 2010).

#### **2.2.5. Determinación de $\beta$ -Caroteno:**

Actualmente la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado para la determinación de carotenoides, debido principalmente a su rápida separación y lo más importante su buena resolución (Colman Martínez, Martínez Huélamo, Miralles, Estruch, & Lamuela Raventós, 2016).

El análisis de carotenoides se realiza de forma rutinaria por HPLC en fase reversa, debido a su mejor eficiencia de separación en mezclas complejas. Las columnas C30 proporcionan mejores resoluciones para los carotenoides con similar polaridad en comparación con las columnas C18, por lo que generalmente las columnas C30 son normalmente seleccionados para la separación de isómeros geométricos (Strati, Sinanoglou, Kora, Miniadis Meimaroglou, & Oreopoulou, 2012).

La elución isocrática es rápida y se puede realizar con un equipo sencillo (con una sola bomba de alta presión y el disolvente premezclado), la línea base es estable, los tiempos de retención son reproducibles y por lo general es idóneo para la determinación de carotenoides. Por otro lado, la elución en gradiente presenta la ventaja de ofrecernos mayor poder de resolución, sensibilidad, y elución de compuestos fuertemente retenidos, por lo que es más utilizado para resolver toda la gama de carotenoides que se encuentran en matrices complejas (Rodriguez Amaya, 2001).

El método más empleado para la determinación de carotenoides es el método del estándar interno ya que minimiza los errores derivados por manipulación de la muestra (evaporación del solvente durante el proceso de extracción) y en los análisis por HPLC como errores en los volúmenes de inyección (Scottish Marine and Freshwater Science, 2010).

El estándar interno se selecciona en función de una serie de requerimientos entre las que destacan: estabilidad, respuesta semejante al analito y no formar parte de la muestra. Entre los estándares internos más utilizados para el análisis de carotenos se encuentran: *trans*- $\beta$ -apo-8-carotenal, la equinenona y etil- $\beta$ -apo-8'-carotenato. (Rodríguez Amaya, 2001)

Para poder cuantificar el contenido de *All-trans*- $\beta$ -caroteno, primero se debe comprobar que existe una respuesta lineal por parte del detector construyendo una curva de calibración que relacione la concentración o peso del estándar del caroteno con la relación del estándar de caroteno y el estándar interno. Luego se obtienen los factores de respuesta del equipo y se comparan con los encontrados para la muestra para obtener los resultados.

El  $\beta$ -Caroteno debido a que se descompone por efecto de la luz, cambiando la estructura original del carotenoide (por ejemplo isomerismo *cis* y *trans*) es un factor a considerar al momento de realizar la extracción. Por esta razón la extracción de carotenoides se debe realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, en ausencia de oxígeno (atmósfera de nitrógeno) y lo más rápido posible, para evitar la degradación por la acción conjunta de los factores mencionados (Martínez Martínez, 2003). Algunas referencias indican que para evitar las pérdidas de carotenoides se emplea el uso de antioxidantes durante el proceso de saponificación como por ejemplo el Butilhidroxitolueno (BHT) que es ampliamente utilizado (Yeverino Gutierrez, 1997).

No existe un procedimiento estandarizado para la obtención de carotenoides debido a la amplia variedad de muestras vegetales y animales que contienen estos compuestos, y la gran variedad de carotenoides que se encuentran en estas muestras (Oliver & Palou, 2000).



Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como hexano, cloroformo, acetato de etilo, entre otros; ya que se deben extraer de tejidos frescos, los cuales presentan un alto contenido de agua y dificultaría una extracción eficiente, por lo que es conveniente eliminar el agua presente en la muestra. Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración. El tejido deshidratado se puede entonces extraer con un solvente apolar.

Una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la cual resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire (Martínez Martínez, 2003).

El aislamiento del  $\beta$ -caroteno involucra 3 etapas:

**a) Extracción:**

Los procedimientos de extracción aplicadas a distintas muestras que contienen  $\beta$ -caroteno comienzan con una extracción con acetona 100% o en combinación con éter de petróleo. Otros grupos prefieren el metanol o una mezcla de metanol (MeOH) y otros solventes más polares, por ejemplo el tetrahidrofurano (THF) (Oliver & Palou, 2000).

**b) Saponificación:**

Después de la extracción de la muestra, tradicionalmente, el segundo paso para la determinación de carotenoides es la saponificación alcalina. Normalmente, la saponificación se lleva a cabo en una solución de KOH: solución acuosa, etanólica y metanólica, y la concentración puede variar de 10 a 60% (w / v).

Las condiciones en las que se lleva a cabo la saponificación pueden ser a temperatura ambiente durante la noche o con calentamiento para reducir el tiempo de reacción (Oliver & Palou, 2000).

Sin embargo, la saponificación extiende el tiempo de análisis, y puede provocar la degradación encontrando pérdidas significativas de carotenoides.

En los últimos años, se han descrito muchos métodos cromatográficos para la determinación simultánea de los carotenoides libres en diferentes muestras de frutas, evitando así la etapa de saponificación, por lo tanto la saponificación debe omitirse del procedimiento analítico siempre que sea posible (Rodríguez Amaya, 2001).

**c) Purificación:**

Uno de los principales problemas asociados con el análisis de los carotenoides es la falta de disponibilidad de compuestos estándar apropiados. La diversidad, inestabilidad inherente y la presencia de isómeros en este grupo de compuestos implica que la mayoría de ellos no estén disponibles comercialmente.

Los carotenoides más comunes ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, zeaxantina luteína, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, etc.) incluso algunos carotenoides más raros (capsantina, capsorrubina, etc.), se pueden adquirir comercialmente.

Sin embargo, la pureza de algunos de estos carotenoides comerciales no es suficiente para un estándar cromatográfico, y por lo tanto requiere algunos pasos adicionales de purificación. (Oliver & Palou, 2000)

Los métodos de cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida (LC) se utilizan para obtener los estándares de carotenoides puros, además el método de HPLC preparativo y fluido supercrítico son ampliamente utilizados para este propósito, aunque estos procesos son costosos (Mai, Truong, & Debaste, 2016).

### **2.3. El $\beta$ -CAROTENO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA:**

El mercado global de  $\beta$ -caroteno en el año 2015 fue alrededor de 432,2 millones de dólares y se prevé que la industria alimentaria experimente un notable crecimiento en los próximos ocho años. Los alimentos y bebidas fueron la aplicación más dominante y representaron más del 30% del valor total en el año 2015. Además las algas que contienen  $\beta$ -caroteno representaron más del 35% de los ingresos totales en el año 2015.

Se espera un aumento significativo debido a la creciente demanda en el consumo de  $\beta$ -caroteno en alimentos, bebidas, suplementos dietéticos, cuidado personal y cosmética.

En la industria alimentaria el  $\beta$ -caroteno es ampliamente utilizado como suplemento nutricional y colorante en la producción de alimentos y bebidas. Se prevé que el sector global de alimentos y bebidas presentará un notable crecimiento a nivel mundial en los próximos años (Grand View Research, 2017).

El  $\beta$ -caroteno es una parte de la familia de los carotenoides derivado de fuentes naturales y sintéticas. La fuente sintética tiene varias desventajas sobre fuentes naturales, algunas desventajas incluyen su contenido nulo de valor nutricional causando varios efectos secundarios como mayor incidencia de cáncer al pulmón y mortalidad, siendo las principales razones de la disminución de la síntesis de carotenos en los próximos ocho años.

Para superar todas estas desventajas las empresas están desarrollando productos de carotenos de fuentes naturales como por ejemplo el uso de algas, frutas y vegetales. En particular el producto a base de algas se espera que presencie una tendencia de crecimiento constante durante el período de pronóstico debido a sus diversas ventajas sobre otras fuentes.

## **2.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO**

**2.4.1. Definición:** La validación de un método analítico se define como la confirmación a través de un examen y la provisión de evidencia objetiva, que cumplen los requisitos particulares para un uso previsto (NTP-ISO/IEC 17025, 2005). Esto se puede interpretar como un proceso en el que se define un requerimiento analítico y se confirma que el método tomado bajo consideración presenta capacidades de rendimiento consistentes con los requerimientos de su aplicación (EURACHEM Guide, 1998).

La validación asigna un alto porcentaje de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento.

#### 2.4.2. Etapas de la validación de un método analítico:

El planeamiento y ejecución de validación implica una serie de etapas que se deben de planificar y desarrollar (INACAL, 2016):

- Definir el objetivo, campo de aplicación o alcance de la validación.
- Definir los parámetros de validación y los criterios de aceptación.
- Desarrollar un procedimiento operacional de validación.
- Definir las pruebas de validación.
- Verificar si las características de operación de los equipos con los que cuenta el laboratorio son compatibles con las que exige el método de estudio.
- Ejecutar las pruebas preliminares de validación
- Ajustar los parámetros de validación del método y los criterios de aceptación si es necesario.
- Ejecutar las pruebas completas de validación.
- Preparar un procedimiento operacional para la ejecución del método de rutina.
- Definir criterios de revalidación (por ejemplo: periodicidad; cambios de personal, condiciones ambientales, equipos, etc.) Definir tipo y frecuencia de verificación de control de calidad analítica del método de rutina.
- Documentar los resultados de las pruebas realizadas.

Es esencial conocer el método a validar y su aplicabilidad: es decir el analito, su concentración y la matriz o matrices en las cuales se desea utilizar. En general, se establece que el laboratorio debe validar (Instituto de Salud Pública, 2010):

- a) Métodos no normalizados:** Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o método nuevos, o bien métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- b) Método normalizado:** Método apropiado para el ensayo dentro de su alcance publicado por organismos de normalización internacional, nacional o regional (ISO, EN, NM, ASTM, BS, DIN, IRAM, etc.)

## **2.5. TIPOS DE VALIDACIONES DE MÉTODOS DE ENSAYO**

### **2.5.1. Validación Prospectiva:**

Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico generando a través del análisis de datos experimentales.

En la validación prospectiva un plan experimental llamado Protocolo de Validación es ejecutado, el cual es determinado en base a la información de apoyo recopilada de los resultados de ensayos experimentales previos. (Instituto de Salud Pública, 2010)

### **2.5.2. Validación Concurrente:**

Está basada en los datos recogidos durante la ejecución efectiva de un proceso que ya se ha implementado en una planta de producción. En esta situación los datos de validación se reúnen durante varios ciclos del proceso continuo y se evalúan para determinar si éste es válido (OMS, 1998).

### **2.5.3. Validación Retrospectiva:**

Se realiza para verificar la capacidad del proceso analítico, cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, es decir en base a datos experimentales que el laboratorio dispone para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc (Instituto de Salud Pública, 2010).

### **2.5.4. Revalidación:**

Es una verificación funcional del método tras cambiar el material analizado o realizar alguna modificación del método empleado. Estos cambios no deben afectar a los resultados en comparación con el método original. Entre los motivos que exigen una nueva validación tenemos (Ramírez Huayhuas & Acosta Castillo, 2007):

- Cambios en el sistema cromatográfico (fase móvil, columna, diluyente, etc.)
- Cambios en los materiales de partida (granulometría, densidad, etc.)

El tipo de validación que se llevó a cabo en el presente trabajo fue prospectiva, debido a que se validó un nuevo método analítico y se determinó en base a la información de apoyo recopilado de los resultados de ensayos experimentales previos.

## **2.6. PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN**

Existen una serie de parámetros que se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito, entre las más importantes se encuentran: la veracidad, la precisión, la selectividad, la linealidad, la sensibilidad, el límite de detección, el límite de cuantificación y la robustez. (AEFI, 2001)

### **2.6.1. Veracidad:**

La veracidad de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados y el valor aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia (ISO 5725-1, 1994).

Una manera para determinar la veracidad es en términos de sesgo donde se mide la diferencia entre el valor promedio esperado de los resultados y un valor de referencia aceptado. El valor de referencia es tomado del certificado del material de referencia (ONA, 2012).

En el caso que no se disponen de un material de referencia certificado, el sesgo se puede expresar en términos de porcentaje de recuperación (%R) que es el cociente entre la cantidad de analito medido y el contenido de la muestra, en el caso ideal se obtiene un 100 %. (Boque, Maroto, Riu, & Rius , 2002)

En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores (EURACHEM Guide, 1998).

El porcentaje de recuperación se calcula de la siguiente manera: (Instituto de Salud Pública, 2010)

$$\%R = \frac{c_f - c_i}{c_a} \times 100\% \dots\dots (1)$$

$$C_f = C_{ma} \times V_{ma}$$

$$C_i = C_m \times V_m$$

$$C_a = C_p \times V_{ap}$$

Donde:

$C_{ma}$ : Concentración de muestra fortificada.

$C_m$ : Concentración de muestra sin fortificar.

$C_p$ : Concentración del estándar.

$V_{ma}$ : Volumen de muestra con adición.

$V_m$ : Volumen de muestra sin adición.

$V_{ap}$ : Volumen adicionado del estándar.

Además el sesgo se puede determinar empleando algunos de los siguientes métodos (AEAS, 2012):

- Empleo de materiales de referencia certificados y preferiblemente sobre materiales de referencia certificados matriciales.
- Comparación del método con un método de referencia con error conocido.
- Participación en ejercicios de intercomparación de laboratorios.

### **2.6.2. Precisión:**

La precisión es el grado de concordancia existente entre los resultados independientes de un ensayo obtenidos en condiciones estipuladas (ISO 5725-1, 1994). Estas condiciones dependen de diferentes factores que pueden variarse entre cada resultado de la prueba, estos factores son el operador, laboratorio, equipo, procedimiento de medición, calibración y el día que se obtienen los resultados de los ensayos.

Dependiendo de los factores se consideran tres niveles de precisión: repetibilidad, precisión intermedia y la reproducibilidad (Boque, Maroto, Riu, & Rius, 2002).

**2.6.2.1. Repetibilidad:** Estudia la variabilidad del método efectuando las pruebas en las mismas condiciones de operación, mismo analista, mismo método de ensayo, misma muestra y durante un corto intervalo de tiempo. La Repetibilidad también se denomina precisión intra-ensayo (AEFI, 2001).

**2.6.2.2. Precisión intermedia:** Estudia la variabilidad del método efectuando las pruebas sobre la misma muestra usando el mismo procedimiento pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas y días dentro de un mismo laboratorio) (AEFI, 2001). Este tipo de precisión intermedia es particularmente útil en los laboratorios ya que proporciona la información de la variabilidad que el laboratorio puede esperar sobre sus resultados, es un estimado de la “reproducibilidad interna” del laboratorio (Boque, Maroto, Riu, & Rius, 2002).

**2.6.2.3 Reproducibilidad:** Estudia la variabilidad del método bajo las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, la misma muestra pero bajo condiciones operativas diferentes (diferentes operadores, equipos y en distintos laboratorios) (EURACHEM Guide, 1998).

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como varianza, desviación estándar de los resultados o también como desviación estándar relativa porcentual (RSD%) (ICH, 2005).

### **2.6.3. Linealidad:**

La linealidad es la capacidad del método para producir resultados que son proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en muestras dentro de un rango de concentración establecido, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida (AEFI, 2001).

Generalmente se obtiene una curva de calibración lineal de la forma (NATA, 2013):

$$y = ax + b \dots\dots (2)$$



Dónde:

y: Respuesta del instrumento analítico

x: Concentración o cantidad del estándar.

a: Pendiente de la recta

b: Intercepto en el origen

Existen ciertos criterios para determinar la linealidad de una curva de calibración, los cuales son (Díaz & Cardenas, 2015):

1. La curva de calibración debe guardar un aspecto visual de línea recta.
2. El valor del coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual a 0,995 (EPA, 2014), y así garantizar la bondad de ajuste de los puntos experimentales a la curva de calibración.
3. Para la correlación de los datos se establece una prueba de hipótesis que consiste en calcular el valor de  $t_{exp}$ :

$$t_{exp} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \dots\dots (3)$$

Donde, n es el número de datos y r es el coeficiente de correlación de Pearson. Si dicho valor de  $t_{exp}$  es mayor que el  $t_{crítico}$  (tablas) para la prueba t de dos colas con n-2 grados de libertad y  $\alpha=0.05$ , se establece que los datos presentan una buena correlación.

4. Se debe realizar la prueba de homocedasticidad, es decir se debe inspeccionar si la distribución de la señal alrededor de un punto tiene la misma varianza en cada punto de la recta como se observa en la Fig. 2.7:

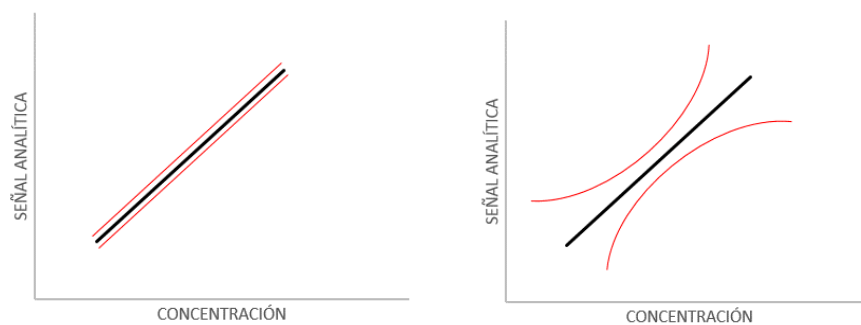


Figura 2.7. Propiedad de Homocedasticidad. Distribución homocedástica (Izquierda), distribución heterocedástica (Derecha).

5. Los residuales de la recta ( $y_i - b - ax_i$ ) deben cumplir una serie de propiedades:
- El número de residuales positivos es aproximadamente igual al número de residuales negativos.
  - Los residuales deben de tener aproximadamente el mismo valor absoluto.
  - Los residuales deben estar distribuidos aleatoriamente.
  - Los residuales no deben mostrar tendencias.

#### 2.6.4. Sensibilidad:

La sensibilidad es la gradiente de respuesta de la curva, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito.

Cuando la respuesta se ha establecido como lineal con respecto a la concentración, es decir, dentro del rango lineal, es un parámetro útil para calcularse y usarse en fórmulas para la cuantificación (EURACHEM Guide, 1998).

En sistemas instrumentales, la sensibilidad está representada por la pendiente de la recta de calibración ( $b$ ) que puede ser determinada mediante procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados (NATA, 2013).

### 2.6.5. Límite de Detección (LOD):

El límite de detección es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto para un nivel de confianza determinado (ICH, 2005).

Si analizamos un blanco de la muestra varias veces se obtendría la señal media ( $\bar{y}_B$ ) y su desviación estándar ( $s_B$ ), el límite de detección se calcularía de acuerdo a la siguiente ecuación (Jurado, 2008):

$$LOD = \bar{y}_B + 3s_B \dots\dots (4)$$

Cuando se tiene una recta de regresión para la calibración de la forma  $y = ax + b$ , una suposición básica del método de los mínimos cuadrados no ponderados es que cada punto en la representación gráfica (incluido el punto que representa el blanco) tiene una variación distribuida normalmente (solo en la dirección y) con una desviación estándar estimada por  $s_{y/x}$  que estima los errores aleatorios en la dirección y:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \dots\dots (5)$$

Donde  $\hat{y}_i$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondiente a los valores individuales de x, es decir los valores de y ajustados y n el número de puntos de calibración.

Por lo tanto es adecuado utilizar  $s_{y/x}$  en lugar de  $s_B$  en la estimación del límite de detección (Miller & Miller, 2002). El valor calculado de la ordenada “a” en el origen, se puede emplear como una estimación de  $y_B$ , la propia señal del blanco debería ser una estimación más exacta de  $y_B$ .

Debido a ello el límite de detección para una recta de calibrado se calcularía como:

$$Y_{LOD} = a + 3s_{y/x}$$

$$LOD = \frac{Y_{LOD} - a}{b} = \frac{3 * s_{y/x}}{b} \dots\dots (6)$$

### **2.6.6. Límite de Cuantificación (LOQ):**

El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar bajo condiciones experimentales descritas, con valores aceptables de precisión y veracidad (AEFI, 2001).

El valor de LOQ se obtiene multiplicando el valor de LOD por 10/3 (Jurado, 2008)

$$LOQ = \frac{10 * S_{y/x}}{b} \dots\dots (7)$$

### **2.6.7. Selectividad:**

Es la capacidad de un método analítico para identificar y/o medir simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de la prueba (AEFI, 2001).

### **2.6.8. Robustez:**

Es la medida de capacidad de un procedimiento analítico de permanecer invariable frente cambios en las condiciones experimentales como por ejemplo la temperatura, pH, concentración de reactivo, tiempo de conservación de los reactivos, tiempos de extracción, composición de la fase móvil, etc (AEAS, 2012).

El objetivo de la prueba de robustez es identificar y si es necesario controlar las condiciones del método que podrían dar lugar a variaciones en los resultados de medición cuando se lleven a cabo en diferentes circunstancias o instalaciones (NATA, 2013).

La forma más eficaz de estudiar la robustez es efectuando un diseño factorial, de esta forma sin realizar todas las combinaciones posibles se puede concluir con el menor número de experimentos que variables son las que más influyen en los resultados (AEFI, 2001).

Una forma de medir la robustez es aplicando el diseño factorial establecido por Youden y Steiner que permite estudiar la influencia o efecto resultante en la modificación de siete variables descritas en el método mediante 8 experimentos.

Los valores nominales indicados para cada factor en el método se designan con letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F y G) y los valores alternativos o modificados se indican con letras minúsculas (a, b, c, d, e, f y g). Los 8 experimentos tienen que presentar 4 parámetros en mayúscula (valores nominales) y 4 en minúsculas (valores alternativos) (AEFI, 2001).

Los factores a estudiar no deben ser necesariamente siete; puede considerarse un número menor de variables, esto no afectará el balance del diseño del experimento pero es importante considerar que siempre se deben llevar a cabo las ocho pruebas de ensayo indicado (Instituto de Salud Pública, 2010).

Tabla 2.4. Prueba de robustez de Youden y Steiner

FACTORES	EXPERIMENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	<b>E</b>	e	<b>E</b>	e	e	<b>E</b>	e	<b>E</b>
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

A partir de los resultados obtenidos, se puede calcular el efecto de cada una de los factores de acuerdo a la siguiente formula:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{n/2} - \frac{\sum Y(-)}{n/2} \dots(8)$$

Donde  $E_x$  son los efectos del factor  $x$ ,  $\sum Y (+)$  es la suma de los resultados del factor  $x$  en el extremo superior del intervalo definido,  $\sum Y (-)$  es la suma de los resultados del factor  $x$  en el extremo inferior del intervalo definido y  $n$  es el número total de experimentos.

El criterio de aceptación de cada factor debe cumplir:

$$E_x < \sqrt{2} S$$

Donde  $S$  es la desviación estándar del procedimiento original calculada desde el último gráfico de control, pero cuando esta desviación estándar no se encuentra disponible como es el caso de un nuevo método, se debe utilizar la desviación estándar de precisión intermedia (FAO Soils Bulletin, 1998).

### **2.6.9. Incertidumbre:**

La incertidumbre es un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al mensurando (EURACHEM, 2012).

La diferencia entre los términos error e incertidumbre se diferencian en que el error es la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero del mensurando y la Incertidumbre toma la forma de un intervalo y cuantifica la duda que se tiene en el resultado de medición (Aguirre Capelo, 2013).

Para determinar el valor de la incertidumbre de un resultado es necesario conocer el valor de la magnitud que se desea medir (mensurando), el modelo matemático y físico que declara la relación entre las magnitudes de entrada y salida (mensurando) representada como una función y las posibles fuentes de incertidumbre implicadas en el proceso de medición (Schmid & Lazos Martínez, 2000).

En la práctica, las fuentes de incertidumbre pueden provenir de diferentes fuentes posibles por ejemplo: Muestreo, extracción incompleta, efectos de matriz, sesgo debido al personal, incertidumbre de pesadas y de equipo volumétrico, resolución instrumental, variación aleatoria, etc (EURACHEM, 2012).

De ser posible debería considerarse todas las posibles fuentes de incertidumbre y no descartar ninguna de ellas, hasta determinarse la mínima contribución que aporta al valor de incertidumbre, pero en muchas ocasiones el conocimiento y experiencia del analista permite calificar de irrelevantes algunas de ellas (Schmid & Lazos Martínez, 2000).

Las fuentes de incertidumbre se agrupan en dos categorías según el método de evaluación “Tipo A” y “Tipo B”. La clasificación en tipo A y B no implica ninguna diferencia de naturaleza entre las componentes de estos tipos, consiste únicamente en dos formas diferentes de evaluar las fuentes de incertidumbre y ambos se basan en distribuciones de probabilidad (GUM, 2012).

- a) **EVALUACIÓN TIPO A:** Evaluación de un componente de incertidumbre por un análisis estadístico de una serie de observaciones obtenido en condiciones de medición definidas (COVENIN, 2000).

Ejemplo: realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad, reproducibilidad y al realizar una regresión lineal.

- b) **EVALUACIÓN TIPO B:** Evaluación de un componente de incertidumbre realizada por otros que no sean análisis estadísticos de una serie de observaciones (COVENIN, 2000).

Ejemplos: La evaluación basada en la información obtenida a partir de un certificado de calibración, valores de referencias procedentes de libros y manuales, u otros medios.

Una vez cuantificadas las posibles fuentes de incertidumbre, éstas se pueden combinar para obtener un único valor que las englobe a todas, y se logra mediante el cálculo de la incertidumbre combinada y expandida. A continuación se define estos 2 tipos de incertidumbre:

#### **2.6.9.1. Incertidumbre Combinada:**

La incertidumbre estándar combinada representada como  $u_c(y)$  representa el resultado de la combinación de las contribuciones de todas las fuentes de incertidumbre  $u(x_i)$  junto con el

impacto de la fuente sobre el mensurando representado por el coeficiente de sensibilidad  $c_i$ : (Schmid & Lazos Martínez, 2000).

$$u_i(y) = c_i * u(x_i) \dots\dots (9)$$

Dónde:  $c_i$ = Coeficiente de sensibilidad =  $(\frac{\partial y}{\partial x_i})^2$

El coeficiente de sensibilidad  $c_i$  indica el peso que supone cada una de las distintas magnitudes de entrada en la magnitud de salida, representada por la función de medición (GUM, 2012).

### **2.6.9.2. Incertidumbre Expandida:**

La incertidumbre expandida es la magnitud que define un intervalo alrededor de una medición y se espera que contenga una fracción grande de la distribución de valores que razonablemente pudieran ser atribuidos al mensurando (COVENIN, 2000).

Debido a que la incertidumbre estándar combinada solo representa un intervalo centrado con una probabilidad del 68,27% aproximadamente de contener el valor verdadero del mensurando, es necesario expandir el intervalo para así aumentar la probabilidad, para ello se utiliza el factor de cobertura  $k$ , el cual se obtiene la incertidumbre expandida: (Hidalgo Colmenares, 2011)

$$U = k * u_c \dots\dots (10)$$

De esta manera la incertidumbre expandida representa el intervalo con cierta probabilidad de los valores que puede tomar el mensurando, por ejemplo para una distribución normal, el valor de  $k$  es igual a 1 y corresponde a una probabilidad del 68,27%, para un  $k$  igual a 2 la probabilidad es del 95,45%, éste es normalmente reportado en los certificados de calibración (Schmid & Lazos Martínez, 2000).

En algunos casos pueden existir mayores exigencias en cuanto al valor del factor de cobertura utilizado para obtener la incertidumbre expandida, pudiéndose solicitar o requerir un valor de  $k$  igual a 3, que corresponde a una probabilidad del 99,7% de confianza (Instituto de Salud Pública, 2010).



## CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

---

### 3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Validar y estimar la incertidumbre de la metodología de extracción del carotenoide *All-trans- $\beta$ -caroteno* propuesta por Van Heukelem & Thomas en biomasa liofilizada de la microalga *Arthrospira platensis*.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar los parámetros característicos de validación; linealidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, precisión, porcentaje de recuperación, robustez e incertidumbre.
- Cuantificar el contenido del carotenoide *All-trans- $\beta$ -caroteno* presente en la microalga *Arthrospira platensis* y presentar su incertidumbre.

## CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1. MATERIALES

#### 4.1.1. Muestra:

- La microalga *Arthrospira platensis* variedad Orovilca liofilizada proveída por la Sala de Procesos – Laboratorio de Biotecnología Acuática, IMARPE.

#### 4.1.2. Reactivos:

- Estándar All-*trans*- $\beta$ -caroteno  $\geq 97\%$  Sigma-Aldrich®
- Estándar interno *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal  $\geq 96\%$  Sigma-Aldrich®
- Metanol grado HPLC  $\geq 99,95\%$  Merck®
- Tetrahidrofurano grado HPLC  $\geq 99,9\%$  J.Baker®
- Acetona grado P.A.  $\geq 99,8\%$  Merck®
- Nitrógeno gas extra puro  $\geq 99,9\%$  Indura.
- Agua Ultrapura.

#### 4.1.3. Equipos:

- Cromatógrafo líquido de alta resolución marca VWR-Hitachi modelo Elite LaChrom con detector arreglo de diodos Hitachi LaChrom modelo L-2455 y software EZChrom Elite Ver. 3.2.1, ubicado en el laboratorio de Análisis instrumental, IMARPE.
- Agitador Vórtex ZX Classic VELP Científica.
- Balanza Analítica de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R.
- Ultrasonido Branson 2510.
- Campana Extractora de Gases LABCONCO.

#### 4.1.4. Materiales de laboratorio:

- Micropipetas de rango variable de 10-100  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- Tubos de ensayo de 10mL con tapa rosca de teflón.
- Viales con filtro de 2 mL de PTFE 0,45 $\mu\text{m}$ .
- Fiolas clase A de 100 y 250 mL.
- Pipetas volumétricas de 10 mL y 25 mL.
- Pipetas Pasteur.

## 4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.2.1. Preparación de los estándares:

- **Estándar de All-trans- $\beta$ -caroteno (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):** Se pesó 10,0 mg de estándar All-trans- $\beta$ -caroteno, se transfirió a una fiola de 100 mL y se añadió 50 mL de Acetona 100%, se sonicó por 5 min y finalmente se enrasó con Acetona 100% para obtener una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- **Estándar interno trans- $\beta$ -Apo-8'-carotenal (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):** Se pesó 10,0 mg de estándar trans- $\beta$ -Apo-8'-carotenal, se transfirió a una fiola de 100 mL y se añadió 50 mL de Acetona 100%, se sonicó por 5 min y finalmente se enrasó con Acetona 100% para obtener una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 4.2.2. Extracción del All-trans- $\beta$ -caroteno en la microalga *Arthrospira platensis*:

(Van Heukelem & Thomas, 2001)

La extracción del All-trans- $\beta$ -caroteno de la microalga *Arthrospira platensis* se realizó en un ambiente sin exposición a la luz.

Se pesó 6,00038 g de *Arthrospira Platensis* liofilizada y se colocó en una fiola de vidrio de 250 mL, luego se añadió 25 mL de estándar interno trans- $\beta$ -Apo-8'-carotenal (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se sonicó en baño de ultrasonido con hielo por 20 min, luego se enrasó con Acetona 100% obteniéndose una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estándar interno en el extracto.

Se inyectó gas nitrógeno durante 1 minuto y se dejó el extracto en reposo cubierto con papel aluminio y refrigerado a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

Al día siguiente se procedió a colocarlos en viales con filtro de 2 mL de PTFE 0,45µm con la ayuda de una pipeta Pasteur para analizarlos por Cromatografía líquida de Alta Resolución.

#### 4.2.3. Condiciones del Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC:

Tabla 4.1. Condiciones instrumentales del sistema cromatográfico

PARÁMETROS INSTRUMENTALES	CONDICIONES
Modo de elución	Gradiente
Fase móvil	A: Metanol B: Tetrahidrofurano
Rampa de elución	93-54% A en 17,2 min, 54% A por 2 min, 54-93% A por 0,5 min, 93% A en 3,3 min.
Flujo de fase móvil	1 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda de detección	460 nm
Columna	Acclaim™ C30 5 µm 4.6 x 250 mm
Temperatura de la columna	25 °C
Temperatura del automuestreador	10 °C
Presión del Sistema	135 psi
Modo de cuantificación	Estándar interno
Modo de calibración	Curva de calibración
Tiempo de corrida	23 min

#### 4.2.4. Metodología de la Validación:

##### 4.2.4.1. Prueba de Normalidad:

Para evaluar la distribución normal de los resultados obtenidos, se inyectó 31 réplicas del extracto de la microalga *Arthorspira platensis* en el Cromatógrafo líquido y se determinó la normalidad de la respuesta del equipo mediante la prueba de Anderson Darling, a un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4.2.4.2. Selectividad:

- **Interferentes en el pico del estándar interno:** Para determinar la presencia de interferentes en el pico del estándar interno, se preparó una muestra de *Arthrospira platensis* sin estándar interno y se comparó los cromatogramas de la muestra de *Arthrospira platensis* con y sin estándar interno.
- **Identificación del pico cromatográfico:** Se identificó el pico cromatográfico por medio del espectro de absorción UV y los tiempos de retención de la muestra y del estándar.
- **Resolución de los picos:** Se analizó el cromatograma de la muestra y se obtuvo el valor de resolución del par de picos consecutivos mediante la siguiente fórmula: (Skoog, Holler, & Nieman, 2001)

$$\text{Resolución} = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \dots\dots (11)$$

Donde:

$t_i$ : Tiempo de retención del pico  $i$  (min).

$w_i$ : Ancho del pico  $i$  (min).

Se estableció el siguiente criterio para el valor de resolución:

Tabla 4.2. Criterio de aceptación para el valor de Resolución

RESOLUCIÓN	CRITERIO
< 1	Mala separación
~1	Separación aceptable
> 1.5	Buena separación

#### 4.2.4.3. Linealidad:

Se construyó la curva de calibración por duplicado empleando 6 niveles diferentes correspondientes al 50, 100, 150, 200, 250 y 300% de la concentración esperada (20 µg/mL)

para el estándar *All-trans*- $\beta$ -caroteno con 100  $\mu$ L de estándar interno (*trans*- $\beta$ -apo-8'-carotenal) con una concentración de 100  $\mu$ g/mL y acetona 100% de acuerdo a la Tabla 4.3. Para verificar la homocedasticidad de la curva de calibración, se inyectó 4 veces el estándar correspondiente a los niveles 3 y 5 (30 y 50  $\mu$ g/mL) de la curva de calibración y se compararon las varianzas de estos niveles.

Tabla 4.3. Construcción de la curva de calibración del estándar

Nivel	Volúmen <i>All-trans</i> - $\beta$ -Caroteno 100 $\mu$ g/ml ( $\mu$ l)	Volúmen estándar interno 100 $\mu$ g/ml ( $\mu$ l)	Volúmen Acetona 100% ( $\mu$ l)	Concentración final ( $\mu$ g/mL)
1	100	100	800	10
2	200	100	700	20
3	300	100	600	30
4	400	100	500	40
5	500	100	400	50
6	600	100	300	60

#### 4.2.4.4. Límite de Detección y de Cuantificación (LOD y LOQ):

Estos valores se obtuvieron de los valores obtenidos de la pendiente (a) y la desviación estándar ( $S_{y/x}$ ) de la curva de calibración.

#### 4.2.4.5. Porcentaje de Recuperación:

Se tomó 1 mL del extracto de microalga *Arthrospira platensis* y se fortificó por triplicado mediante la adición de volúmenes conocidos (67  $\mu$ L, 143  $\mu$ L y 231  $\mu$ L) del estándar puro *All-trans*- $\beta$ -caroteno (100  $\mu$ g/mL) correspondientes al 25, 50 y 75% de la concentración estimada del analito en el extracto (20  $\mu$ g/mL), encontrándose dentro el rango de linealidad (10 - 60  $\mu$ g/mL). (Instituto de Salud Pública, 2010), (AEFI, 2001).

Los niveles 25, 50 y 75 % se definieron por criterio del analista cubriendo el rango de trabajo establecido en la etapa de linealidad.

Los resultados se expresaron en porcentaje de recuperación y se propuso como criterio de aceptación el rango teórico de 80 – 110% para concentraciones alrededor de los 10  $\mu$ g/mL propuestos por diferentes organismos internacionales. (NordVal , 2010).

#### 4.2.4.6. Precisión:

- **Precisión a condiciones de repetibilidad:** La prueba de repetibilidad de la respuesta del equipo y del método se realizó empleando el mismo analista bajo las mismas condiciones, en un mismo día con intervalos cortos de tiempo.

Se determinó el RSD% para la repetibilidad de la respuesta del equipo mediante la relación de áreas del estándar *All-trans*- $\beta$ -caroteno con respecto al estándar interno y para la repetibilidad del método se determinó mediante las respuestas de concentración que fueron cuantificadas construyendo una curva de calibración.

Se propuso como criterio de aceptación: RSD% < 6% (AOAC, 2002)

- **Precisión intermedia del método:** La prueba se realizó empleado 2 analistas y analizando la misma muestra durante 6 diferentes días. Se determinó el RSD<sub>R</sub>% de precisión intermedia y se propuso el criterio de aceptación usando el RSD<sub>H</sub> de Horwitz.

#### 4.2.4.7. Robustez:

Se aplicó la metodología de Youden-Steiner (Da Costa Cesar & Pianetti, 2009) y se seleccionaron los siguientes factores de acuerdo al criterio del laboratorio: *Temperatura de la columna*: A = 25 °C, a = 30 °C; *% Metanol (Fase móvil)*: B = 93%, b = 88%; *Longitud de onda*: C = 460 nm, c = 450 nm; *Flujo*: D = 1 mL/min, d = 1,2 mL/min; *Volumen de inyección*: E = 20  $\mu$ L, e = 30  $\mu$ L; *Exposición a luz*: F = sin exposición a luz, f = con exposición a luz y *Adición de BHT 0,1%*: G = sin BHT, g = con BHT.

Tabla 4.4. Diseño factorial de Youden-Steiner

FACTORES	EXPERIMENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura de la columna	A	A	A	A	a	a	a	a
% Metanol (Fase móvil)	B	B	b	b	B	B	b	b
Longitud de onda	C	c	C	c	C	c	C	c
Flujo	D	D	d	d	d	d	D	D
Volumen de inyección	E	e	E	e	e	E	e	E
Exposición a luz	F	f	f	F	F	f	f	F
Adición de BHT	G	g	g	G	g	G	G	g

## CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. PRUEBA DE NORMALIDAD:

Los resultados obtenidos en la prueba de normalidad se muestran en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1. Valores de la relación de áreas del All-*trans*- $\beta$ -caroteno y el estándar interno *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal de las 31 réplicas de la muestra *Arthrospira platensis* para la prueba de normalidad.

RÉPLICA	AREA All- <i>trans</i> - $\beta$ - Caroteno	AREA I.S.	RELACIÓN DE ÁREAS A All- <i>trans</i> $\beta$ -caroteno / A I.S.
1	13872167	11874245	1,1683
2	14108567	11965375	1,1791
3	13985633	11869895	1,1782
4	14697227	12354179	1,1897
5	14103760	11839883	1,1912
6	14454320	12085335	1,1960
7	14467151	12073552	1,1983
8	14263804	11922063	1,1964
9	14637694	12193002	1,2005
10	14196713	11808532	1,2022
11	15440278	12730786	1,2128
12	14013810	11681672	1,1996
13	14277508	11855199	1,2043
14	14624093	12097004	1,2089
15	14465928	12008017	1,2047
16	14576865	12046211	1,2101
17	12694344	10582315	1,1996
18	14552094	12091729	1,2035
19	14570751	12063091	1,2079
20	14436228	11959928	1,2070
21	14627694	12079655	1,2109
22	14510804	12002504	1,2090
23	14745113	12412837	1,1879
24	14960910	12589221	1,1884
25	14584801	12345922	1,1813
26	14848735	12570561	1,1812
27	14527848	12320669	1,1791
28	14682455	12406688	1,1834
29	14033305	11938029	1,1755
30	15019170	12688884	1,1836
31	14351777	12240223	1,1725

Dónde: I.S.: Estándar interno



A continuación se muestra la gráfica de probabilidad obtenido con los datos de la Tabla 5.1.

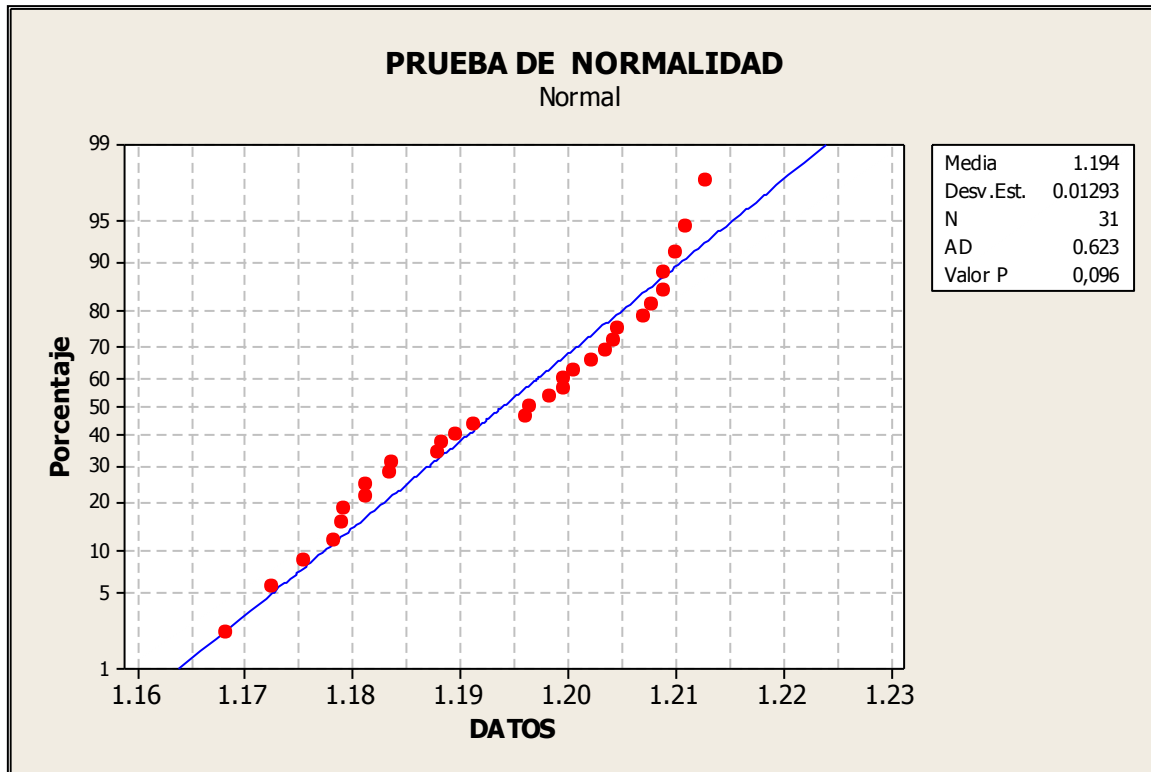


Figura 5.1. Gráfico de probabilidad de las relaciones de Áreas usando el software Minitab 16.

La Figura 5.1 muestra que existe un buen ajuste entre los datos debido a que la gran mayoría de los datos se encuentran sobre la recta, por lo que se puede concluir que los datos presentan una distribución normal.

También se puede concluir la normalidad de los datos analizando los valores con el estadístico de Anderson Darling (AD).

El estadístico de la prueba es denotado como  $A^2$ , y se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$A^2 = AD - n \dots (12)$$

$$AD = \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^n (1 - 2i) [\ln F(Z_i) + \ln(1 - F(Z_{n+1-i}))] \dots (13)$$

Donde:

n: Número de datos

Z: variable aleatoria normal estándar con  $\mu=0$  y  $\sigma^2=1$

La creación de esta variable Z se realiza por medio de la transformación llamada estandarización de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{X_i - \bar{x}}{\sigma} \dots\dots (14)$$

F (Z): Distribución de probabilidades acumulada de los datos normalizados  $Z_i$

$X_i$ : Datos obtenidos ordenados de menor a mayor

### CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

La hipótesis nula  $H_0$  se rechaza con un nivel de significancia  $\alpha$  si:

$$A^2 > A^2_{\text{crítico}} \left(1 + \frac{0.75}{n} + \frac{2.25}{n^2}\right) \dots\dots (15)$$

Donde:

$$AD^* = A^2_{\text{crítico}} \left(1 + \frac{0.75}{n} + \frac{2.25}{n^2}\right) \dots\dots (16)$$

Por lo tanto:

$$A^2 < AD^* \dots\dots (17)$$

Se acepta la hipótesis nula  $H_0$  y los datos presentan una distribución normal.

Para concluir si los resultados presentan una distribución normal se aplicó el estadístico de Anderson Darling (AD) comparándolo con el valor crítico (ver Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Valores del estadístico Anderson Darling. Prueba de Normalidad.

ESTADÍSTICO	RESULTADO
$A^2$	0,622
$AD^*$	0,772
<b>Valor <math>A^2_{\text{crítico}}</math> (<math>\alpha=0,05</math>)</b>	<b>0,752</b>

De acuerdo a la Tabla 5.2 se acepta la hipótesis nula si  $A^2 < AD^*$ . Es decir, se concluye que los datos presentan una distribución normal.

## 5.2 SELECTIVIDAD:

### 5.2.1. Interferentes en el pico del estándar interno (I.S):

La Figura 5.2 muestra la comparación de cromatogramas de la muestra de *Arthrospira platensis* con estándar interno (Muestra\_con\_IS) y muestra de *Arthrospira platensis* sin estándar interno (Muestra\_sin\_IS).

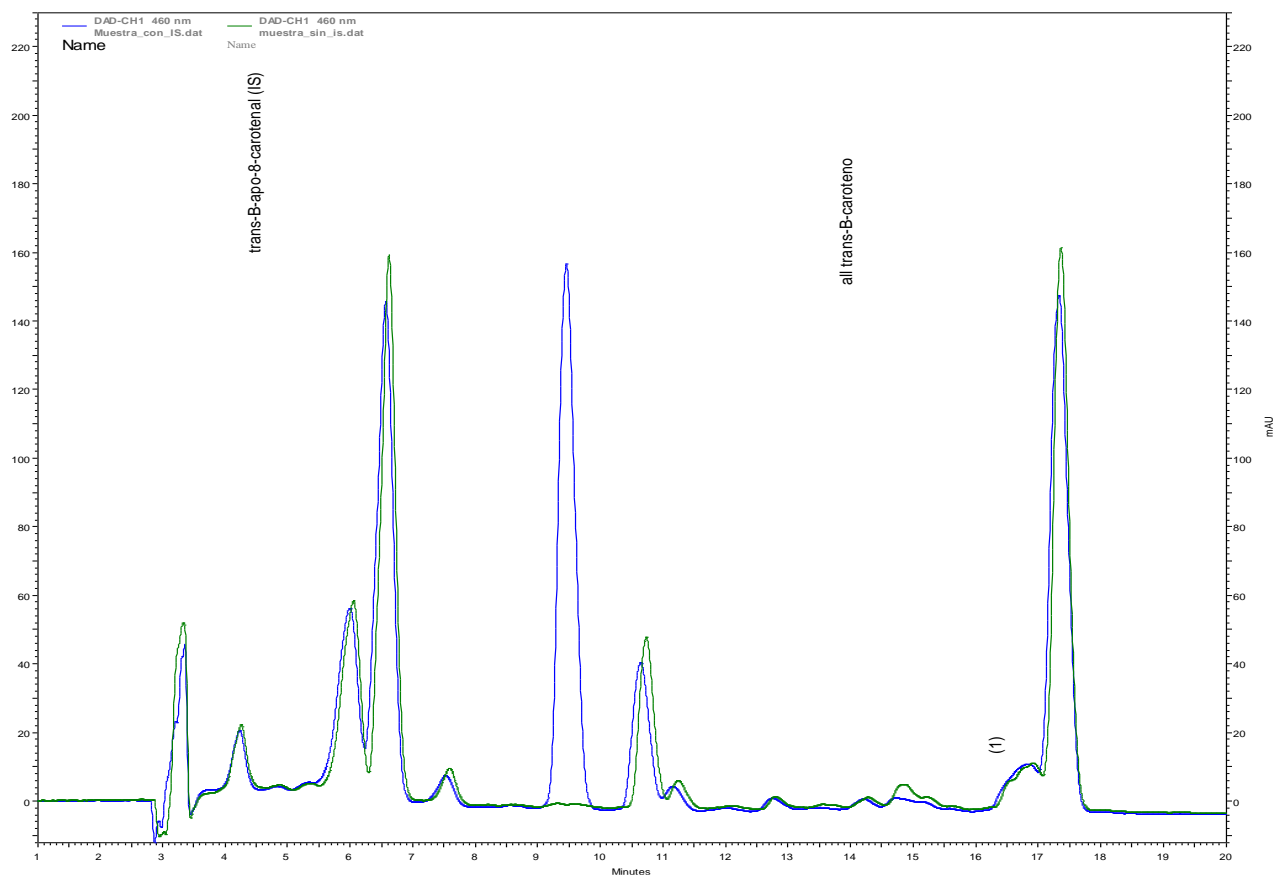


Figura 5.2. Comparación de cromatogramas de la muestra con estándar interno (Muestra\_con\_IS) y la muestra sin estándar interno (Muestra\_sin\_IS)

Se observa que el pico cromatográfico del estándar interno *trans*- $\beta$ -apo-8'-carotenal no contiene ningún otro pico cromatográfico presente en la muestra de *Arthrospira platensis* por lo que se puede aseverar que no presenta interferencias, debido a ello se le consideró como el estándar interno (I.S) adecuado para las pruebas de validación.

Una mejor visualización del pico cromatográfico del estándar interno, se observa en la Figura 5.3.

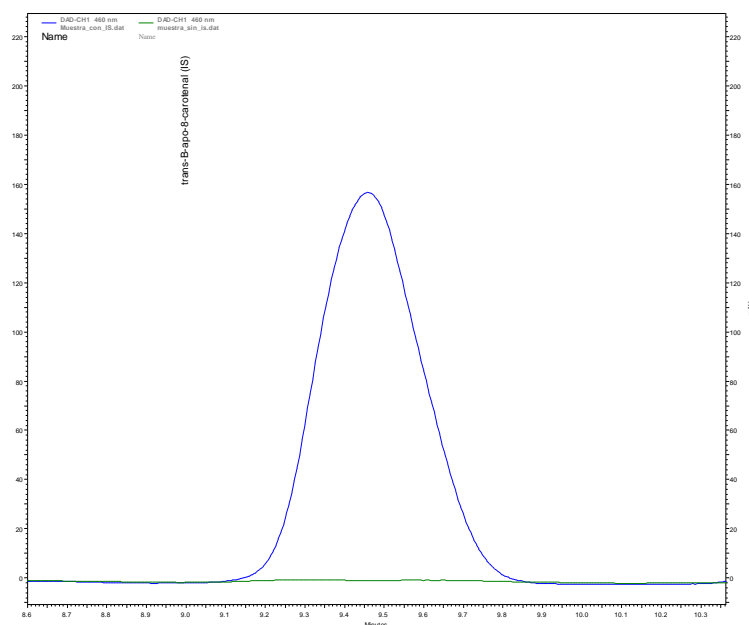


Figura 5.3. Pico cromatográfico de la muestra con estándar interno (Muestra\_con\_IS) y sin estándar interno (Muestra\_sin\_IS)

**5.2.2. Identificación de los picos cromatográficos:** Se comparó los espectros de absorción y los tiempos de retención del pico cromatográfico *All-trans*- $\beta$ -caroteno presente en la muestra de *Arthrospira platensis* con el estándar certificado de *All-trans*- $\beta$ -caroteno a una concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$  preparado en la curva de calibración. Los espectros de absorción se muestran en la figura 5.4.

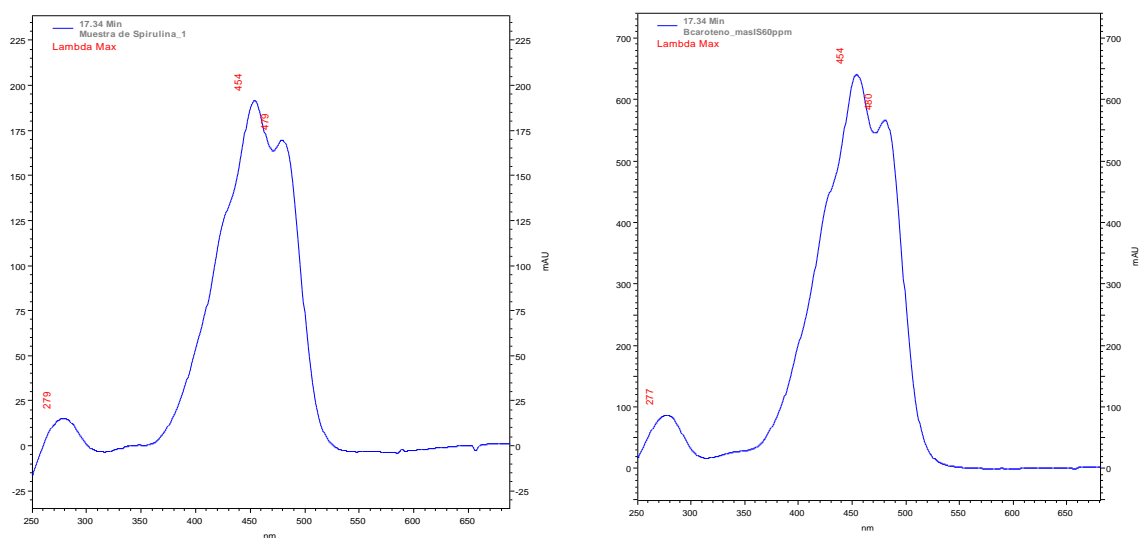


Figura 5.4. Espectro de absorción UV del carotenoide All-*trans*- $\beta$ -Caroteno presente en la microalga *Arthrospira platensis* (izquierdo) y espectro de absorción UV del carotenoide All-*trans*- $\beta$ -Caroteno presente en el estándar certificado (derecho).

La Figura 5.4 muestra que los espectros de absorción de la muestra de *Arthrospira platensis* y el estándar certificado son relativamente iguales y presentan longitudes de onda máxima de 454 y 479 a 480 nm característicos del carotenoide All-*trans*- $\beta$ -caroteno de longitud de onda máxima de 453 y 480 nm según (Wright, y otros, 1991).

Además el pico cromatográfico de la muestra eluye con el mismo tiempo de retención que el estándar certificado All-*trans*- $\beta$ -caroteno (17,33 min), debido a ello se puede confirmar que la muestra presenta el carotenoide All-*trans*- $\beta$ -caroteno.

**5.2.2. Resolución de los picos:** La Figura 5.2 muestra el pico cromatográfico del estándar interno *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal bien resuelto (Resolución = 1,24), a diferencia del pico cromatográfico All-*trans*- $\beta$ -Caroteno (Resolución = 0,48), y es debido a la aparición de un pico cromatográfico de menor tamaño (pico1) ubicado al lado izquierdo.

Probablemente el pico 1 sea el isómero 9-*cis*- $\beta$ -Caroteno, también característico de la microalga *Arthrospira platensis* (Tang & Suter, 2011). Estos isómeros *cis* son difíciles de separar por cromatografía líquida (Rodríguez Amaya, 2001), por ello se obtuvo una baja resolución del All-*trans*- $\beta$ -caroteno, pero aceptable para las pruebas de validación debido a

una buena integración del pico cromatográfico con ayuda del software EZChrom Elite Ver. 3.2.1

Una forma de comprobar si el pico 1 corresponde al isómero *9-cis-β*-Caroteno es comparando sus características espectrales con lo reportado en la literatura. Se observa la Figura 5.5 el espectro de absorción del pico 1:

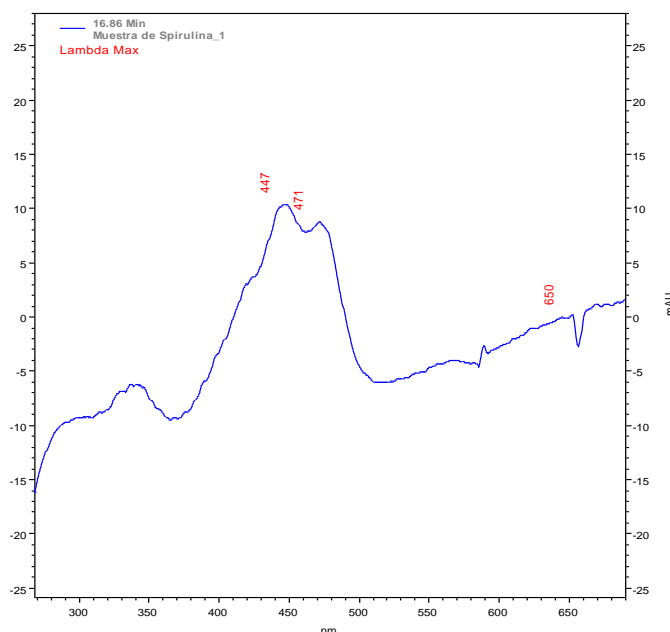


Figura 5.5. Espectro de absorción UV del pico cromatográfico (1)

El pico 1 muestra longitudes de onda máxima de 447 y 471 nm coincidiendo con lo señalado según (Xu Qun & Rohrer, 2012) para el isómero *9-cis-β*-Caroteno (446,4 y 472,2 nm).

Otra manera de comprobar es utilizando el valor de Q-ratio del pico 1 obteniéndose a partir de su espectro de absorción y compararlo con lo reportado en la literatura.

El Q-ratio se define como el cociente entre la absorción máxima del pico *cis* ( $A_{\lambda_{\max \text{ pico cis}}}$ ), que generalmente se encuentra entre longitudes de onda de 330 y 345nm y la absorción máxima del pico promedio ( $A_{\lambda_{\max \text{ pico promedio}}}$ ), obteniéndose la siguiente ecuación:

$$Q\text{-ratio} = \frac{A_{\lambda_{\max} \text{ pico cis}}}{A_{\lambda_{\max} \text{ pico promedio}}} \dots\dots (18)$$

El parámetro Q-ratio se utiliza para identificar diferentes isómeros-cis de los carotenoides (Jing, Qun, & Rohrer, 2012).

El pico 1 muestra un valor máximo de absorción del pico cis de 3,37 mAU y un valor máximo de pico promedio de 19,87 mAU, luego reemplazando dichos valores en la ecuación (18) se obtiene un valor Q-ratio de 0,17; igual a lo reportado según (Tien Lin, y otros, 2010) para el isómero *9-cis-β*-Caroteno.

Estas 2 maneras de identificación, señalan que probablemente el pico 1 sea el isómero *9-cis-β*-Caroteno, pero para tener mayor certeza, se debe comparar con un estándar certificado de dicho isómero o mediante técnicas analíticas instrumentales sofisticadas como espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN).

Tabla 5.3. Valores típicos de tiempo de retención, resolución de los picos y ancho de pico obtenidos en la prueba de validación.

Carotenoide	Tiempo de Retención	Ancho del Pico	Resolución
	t <sub>r</sub> (min)	w <sub>i</sub> (min)	
<i>trans</i> -β-Apo-8'-carotenal (I.S)	9,27	1,19	1,24
All- <i>trans</i> -β-Caroteno	17,33	0,99	0,48

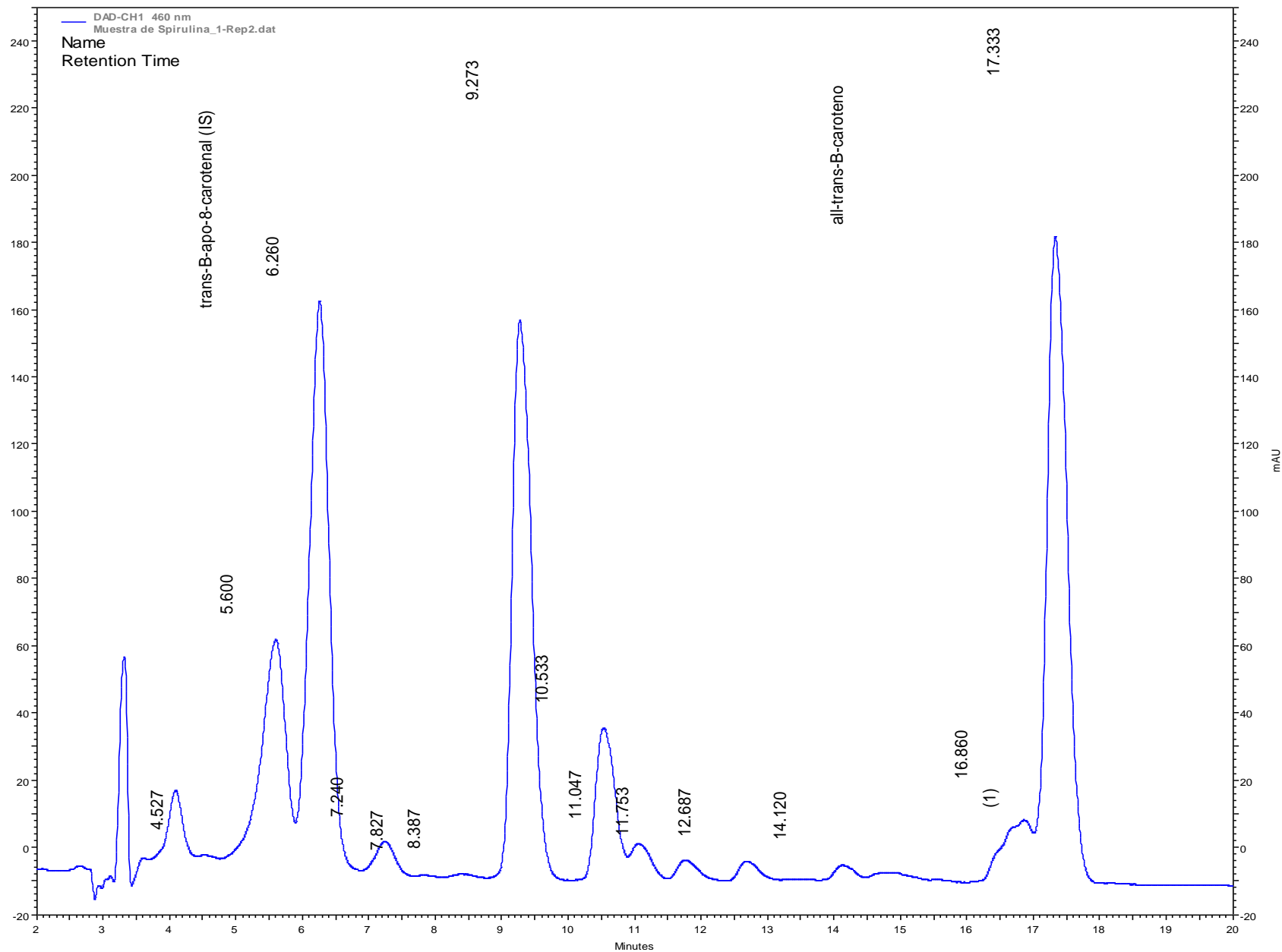


Figura 5.6. Cromatograma típico obtenido en las pruebas de validación y los tiempos de retención



### 5.3. LINEALIDAD:

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la construcción de la curva de calibración de acuerdo a la Tabla 4.3 en el rango de concentración de 10-60 µg/mL.

Tabla 5.4. Resultados obtenidos de la linealidad del método para para la cuantificación del carotenoide All-trans-β-caroteno.

RÉPLICAS	CONCENTRACIÓN					
	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL	50 µg/mL	60 µg/mL
Relación de áreas 1	0,611	1,312	2,143	3,025	3,897	4,654
Relación de áreas 2	0,589	1,309	2,137	3,041	3,905	4,658
Relación de áreas 3	0,596	1,324	2,146	3,051	3,900	4,650
Relación de áreas 4	0,596	1,347	2,151	3,045	3,900	4,641
Promedio	0,598	1,323	2,144	3,041	3,900	4,651
Desviación estándar	0,009	0,017	0,006	0,011	0,004	0,007
RSD %	1,56%	1,29%	0,26%	0,36%	0,09%	0,16%

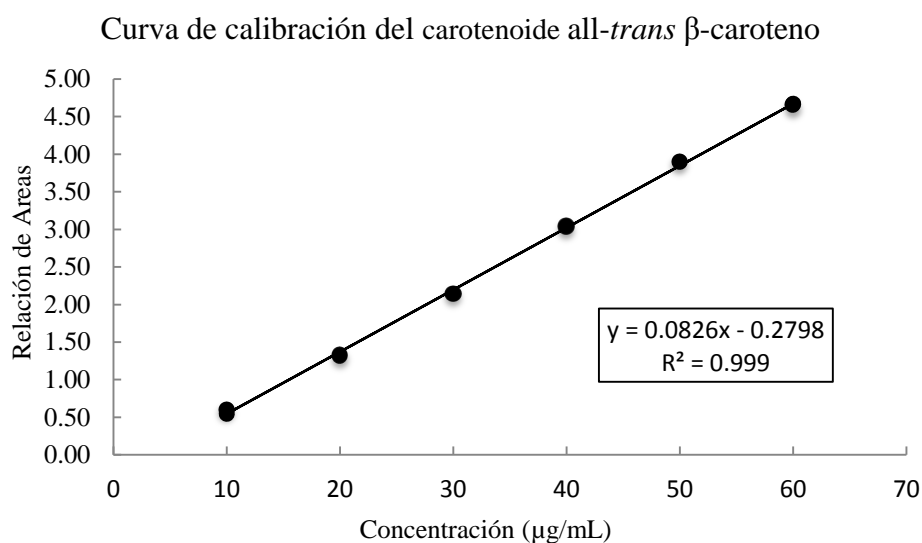


Figura 5.7. Rango lineal de la curva de calibración para la cuantificación del carotenoide All-trans β-Caroteno

De la Figura 5.7 se puede obtener los principales parámetros de la curva de calibración para la determinación de la linealidad.

Tabla 5.5. Características de la curva de calibración para el análisis de la linealidad del método

PARÁMETROS DE LINEALIDAD	RESULTADO
Coefficiente de correlación (r)	0,9997
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0,9990
Pendiente	0,0826
Intercepto	-0,2798
Número de repeticiones (n)	4

Uno de los criterios del presente estudio para evaluar la linealidad del método fue el coeficiente de correlación “r”. La Tabla 5.5 muestra los resultados obtenidos de este parámetro, dando como resultado un valor de 0,9997 el cual superó el valor de referencia  $r \geq 0,995$  propuesto por (EPA, 2014) y usualmente aceptados en los laboratorios, este resultado indica que se cumplió el criterio establecido asegurando la prueba de linealidad de los datos.

Además otro criterio para evaluar la linealidad es mediante una prueba estadística, el test de Student, el cual se calcula un valor t experimental ( $t_{exp}$ ) con n-2 grados de libertad y se compara con un valor t de tabla ( $t_{tabla}$ ) generalmente al 95% de confianza ( $\alpha=0,05$ ), dos colas en este caso para un “n” que depende de los niveles de calibración.

De acuerdo a la ecuación (3) se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|0,9997|\sqrt{6-2}}{\sqrt{(1-0,9990)}} = 63,22$$

El valor de prueba  $t_{exp}$  que determina la correlación de los datos supera el valor  $t_{tabla} = 2,78$  ( $\alpha=0.05$ , 4 grados de libertad) garantizando la buena correlación que existe entre los datos.

Tabla 5.6. Valores de la relación de áreas y varianzas de la prueba de homocedasticidad.

<b>NIVEL</b>	<b>RELACIÓN DE ÁREAS</b>
<b>Nivel 3</b>	
1	2,1427
2	2,1373
3	2,1455
4	2,1509
$S_3^2$	$3,1 \times 10^{-5}$
<b>Nivel 5</b>	
1	3,8969
2	3,9054
3	3,8998
4	3,8996
$S_5^2$	$1,2 \times 10^{-5}$
$F_{exp}$	2,52
$F_{critico}$	9,28

Para calcular el valor de la prueba  $F_{exp}$  se determina la relación del mayor entre el menor valor de las varianzas ( $s^2$ ), como se muestra en la ecuación 19:

$$F_{exp} = \frac{S_3^2}{S_5^2} \dots\dots (19)$$

La tabla 5.6 muestra el valor de la prueba de homocedasticidad donde el  $F_{exp}$  es menor al  $F_{critico}=9,28$  ( $\alpha=0.05$ , 3,3 grados de libertad) para cada caso, obteniendo información de que las varianzas entre los niveles 3 y 5 de la curva de calibración son iguales y por ende existe homocedasticidad entre estos puntos.

La gráfica de residuos (Figura 5.8) no muestra ninguna anomalía, y cumple con todas los criterios de aceptación enumerados en la página 26, lo que indicaría una evidencia más de linealidad de los datos.

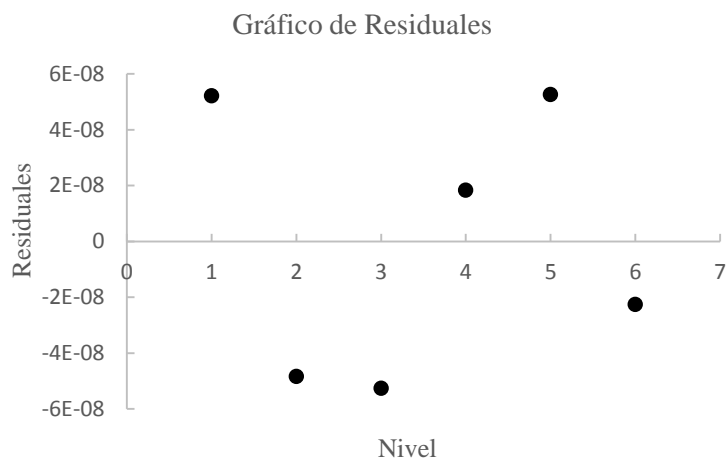


Figura 5.8. Gráfico de residuales de la curva de calibración

El límite de detección y cuantificación se determinaron experimentalmente a partir de los valores obtenidos de la curva de calibración en el rango lineal establecido.

Se utilizó la desviación estándar de regresión  $S_{y/x}$  de la curva de calibración para el cálculo del límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). La sensibilidad se obtuvo de la pendiente de la curva de calibración en la prueba de linealidad del método. Los resultados se muestran en la Tabla 5.7

Tabla 5.7. Valores de límite de detección, cuantificación y sensibilidad

Límite de Detección (LOD)	1,96 µg/mL
Límite de Cuantificación (LOQ)	6,49 µg/mL
Sensibilidad	0,0826

Los valores de LOD y LOQ fueron obtenidos usando las ecuaciones (6) y (7), encontrándose en el orden de unos cuantos microgramos por mililitro señalando una buena sensibilidad del equipo de cromatografía líquida. Estos valores pequeños son importantes porque se podría replantear el método para trabajar con cantidades de muestra menores debido a que en el mundo marino no siempre se dispone de una gran cantidad de muestra para los análisis.

## 5.4. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN:

La Tabla 5.8 muestra los resultados obtenidos en la prueba de recuperación de muestras fortificadas aplicando la ecuación (1) y obteniéndose un valor promedio de 98,30%.

Tabla 5.8. Valores del porcentaje de recuperación del método analítico.

Nivel de concentración	Relación de Áreas	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	(C <sub>r</sub> -C <sub>i</sub> )	Recuperación (%) (C <sub>r</sub> -C <sub>i</sub> )/ C <sub>a</sub>
Muestra sin fortificar	1,227	19,243	19,351	-	-
	1,233	19,323			
	1,246	19,487			
Nivel 1 (25%)	1.631	24,286	24,188	6,602	98,54%
	1.610	24,021		6,278	93,70%
	1.623	24,187		6,495	96,93%
Nivel 2 (50%)	2,023	29,185	29,332	13,990	97,83%
	2,053	29,557		14,406	100,74%
	2,028	29,239		14,130	98,81%
Nivel 3 (75%)	2,496	35,085	34,368	23,798	103,25%
	2,451	34,524		23,205	100,46%
	2,366	33,469		21,865	94,66%
				Promedio (n = 9)	98,30%
				Desviación Estándar	0,029
				RSD (%)	3,00%

La evaluación de la veracidad muestra porcentajes de recuperación dentro del rango de aceptación (80 - 110%) propuesto según (NordVal , 2010), en los 3 niveles estudiados para concentraciones alrededor de los 10 ppm aseverando que el efecto de la matriz no es significativo.

Además se realizó el test estadístico t Student comparando el  $t_{exp}$  con el  $t_{tabla}$  para (n-1 grados,  $\alpha=0,05$ ).

Si el  $t_{exp}$  resulta menor que el  $t_{tabla}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%, por lo que el método tiene la veracidad requerida para un nivel de confianza al 95%.

La ecuación para calcular el  $t_{exp}$  es la siguiente: (AEFI, 2001)

$$t_{exp} = \frac{|100-R|*\sqrt{n}}{\% RSD} \dots\dots (20)$$

Reemplazando los valores obtenidos en la prueba de recuperación y reemplazando en la ecuación (20) se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|100-98,3|\sqrt{9}}{3,00} = 1,70$$

De acuerdo con los resultados obtenidos el  $t_{exp}$  es menor al  $t_{tabla} = 1,85$  ( $\alpha = 0.05$ , 8 grados de libertad) por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%, por lo tanto se puede concluir que la metodología es veraz.

## 5.5. PRECISIÓN:

### 5.5.1 Precisión a condiciones de repetibilidad:

La precisión a condiciones de repetibilidad se expresó como desviación estándar relativa (RSD%) de acuerdo a las siguientes ecuaciones: (ISO 5725-2, 1994)

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \dots\dots (21)$$

$$RSD(\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \dots\dots (22)$$

Donde:

$S_r$ : desviación estándar de repetibilidad

$\bar{x}$ : Promedio

$n$ : Número de réplicas

$x_i$ : Resultados obtenidos

Las Tablas 5.9 y 5.10 muestran los resultados obtenidos correspondientes a la prueba de precisión a condiciones de repetibilidad para la respuesta del equipo y el método analítico.

Tabla 5.9. Resultados de la precisión a condiciones de repetibilidad de la respuesta del equipo

<b>Réplica del estándar All-trans <math>\beta</math>-Caroteno (20 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>RELACIÓN DE ÁREAS</b>
1	1,3944
2	1,3948
3	1,3960
4	1,4007
5	1,3991
6	1,4037
7	1,4047
8	1,4085
9	1,4075
10	1,4099
Promedio	1,4019
Desviación estándar	0,0057
RSD (%)	0,41%

Tabla 5.10. Resultados de la precisión a condiciones de repetibilidad del método analítico

<b>Réplica de la muestra de <i>Arthrospira platensis</i></b>	<b>Concentración de All-trans <math>\beta</math>-Caroteno (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	19,47
2	19,62
3	19,61
4	19,77
5	19,79
6	19,86
7	20,01
8	20,07
9	20,04
10	19,74
Promedio	19,80
Desviación Estándar	0,199
RSD (%)	1,01%

Se observa que los valores de RSD% para la respuesta del equipo (0,41%) y el método analítico (1,01%) no superan el criterio de aceptación propuesto  $RSD < 6\%$  según (AOAC, 2002), ello indica que hay un alto grado de concordancia en el ensayo cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

### 5.5.2 Precisión Intermedia:

Para la evaluación de la precisión intermedia se realizó el análisis de Horwitz a partir de la concentración del analito C, de acuerdo a la ecuación (23) (Rivera & Rodríguez, 2014):

$$RSD_H = 2^{(1-0,5*\log C)} \dots\dots (23)$$

El valor de  $RSD_R$  obtenido en condiciones de precisión intermedia se compara con el predicho por Horwitz ( $RSD_H$ ) mediante el parámetro de Horrat (Codex Alimentarius Commission, 2010) de acuerdo a la ecuación (24):

$$Horrat = \frac{RSD_R}{RSD_H} \dots\dots (24)$$

Si el valor del parámetro Horrat es igual o menor a 2 se puede decir que el método tiene valores aceptables de precisión intermedia (Jurado, 2008).

EL valor de  $RSD_R$  en condiciones de precisión intermedia se determinó usando las ecuaciones propuestas por (ISO 5725-2, 1994), calculando la varianza de repetibilidad, varianza entre laboratorios y varianza de reproducibilidad (como precisión intermedia).

La varianza de repetibilidad ( $S^2_{rj}$ ):

$$S^2_{rj} = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij}-1)s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij}-1)} \dots\dots (25)$$

La varianza entre laboratorio ( $S^2_{Lj}$ ):

$$S^2_{Lj} = \frac{s^2_{dj} - S^2_{rj}}{\bar{n}_j} \dots\dots (26)$$



Donde:

$$S_{dj}^2 = \left(\frac{1}{p-1}\right) \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2 \dots\dots (27)$$

$$\bar{n}_j = \left[ \sum_{n=1}^p n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \right] \dots\dots (28)$$

La varianza de reproducibilidad, como precisión intermedia ( $S_{Rj}^2$ ) es la suma de la varianza de repetibilidad y la varianza entre laboratorio y se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S_{Rj}^2 = S_{rj}^2 + S_{Lj}^2 \dots\dots (29)$$

Tabla 5.11. Valores de precisión intermedia del método. Se muestran los valores promedios de 4 réplicas obtenidos por los analistas A y L en 6 diferentes días.

Analista- Días	Concentración de All-trans $\beta$ -Caroteno ( $\mu\text{g/mL}$ )
A-1	19,368
A-2	19,470
A-3	19,152
A-4	19,603
A-5	19,998*
A-6	19,242
L-1	18,776*
L-2	19,101
L-3	19,068
L-4	19,292
L-5	19,514
L-6	19,056
Promedio	19,287

\*: Valores atípicos eliminados mediante la prueba de h y k de mandel (Anexo A)

La Tabla 5.12 muestra los valores obtenidos en la prueba de precisión intermedia del método en 6 días diferentes, al reemplazar dichos valores en las ecuaciones (25-29) se obtiene:

Tabla 5.12. Valores de Varianza de repetibilidad, entre laboratorios y de precisión intermedia

Varianza de repetibilidad	$(S^2_{RJ})$	$5,00 \times 10^{-2}$
Varianza entre laboratorios	$(S^2_{LJ})$	$2,614 \times 10^{-2}$
Varianza de reproducibilidad (precisión intermedia)	$(S^2_{RJ})$	0,076

La precisión intermedia se expresó como desviación estándar relativa  $RSD_R$  de acuerdo a la siguiente ecuación: (ISO 5725-2, 1994)

$$RSD(\%) = \frac{S_R}{\bar{x}} \dots\dots (30)$$

Donde:

$S_R$ : desviación estándar de precisión intermedia

$\bar{x}$ : Promedio

Al reemplazar el valor promedio de la concentración  $\bar{x} = C = 19,28 \mu\text{g/mL}$  en la ecuación de Horwitz (23) y la varianza de reproducibilidad como precisión intermedia en la ecuación (30) se obtiene:  $RSD_H = 2,56\%$  y  $RSD_R = 1,43\%$

Finalmente calculando el parámetro de Horrat según la ecuación (24) se obtiene un valor de 0,58 menor a 2 cumpliendo con el criterio de aceptación, y demostrando que el método analítico tiene valores aceptables de precisión intermedia.

## 5.6. ROBUSTEZ:

La tabla 5.13 muestra los valores de las ocho pruebas realizadas según la metodología de Youden- Steiner:

Tabla 5.13. Valores obtenidos según la metodología de Youden-Steiner

FACTORES		EXPERIMENTOS							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura de la columna	A= 25 °C a= 30 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
% Metanol (Fase Móvil)	B=93 % b=88 %	93%	93%	88%	88%	93%	93%	88%	88 %
Longitud de onda	C=460 nm c=450 nm	460 nm	450 nm	460 nm	450 nm	460 nm	450 nm	460 nm	450 nm
Flujo	D=1mL/min d=1,2mL/min	1mL/min	1mL/min	1,2mL/min	1,2mL/min	1,2mL/min	1,2mL/min	1mL/min	1mL/min
Volumen de inyección	E=20 µL e=30 µL	20 µL	30 µL	20 µL	30 µL	30 µL	20 µL	30 µL	20 µL
Exposición a la luz	F=sin exposición a luz f=con exposición a luz	sin exposición a luz	con exposición a luz	con exposición a luz	sin exposición a luz	sin exposición a luz	con exposición a luz	con exposición a luz	sin exposición a luz
Adición de BHT 0,1% (Butilhidroxitolueno)	G=Sin BHT g=Con BHT	Sin BHT	Con BHT	Con BHT	Sin BHT	Con BHT	Sin BHT	Sin BHT	Con BHT
Concentración réplica 1 (µg/mL)		20,41	22,48	21,75	21,14	20,30	23,66	23,54	22,05
Concentración réplica 2 (µg/mL)		20,37	22,50	21,76	21,24	20,40	23,72	23,79	21,98
Concentración promedio (µg/mL)		20,39	22,49	21,75	21,19	20,35	23,69	23,66	22,01

Con los valores obtenidos de la Tabla 5.13 se construyó la Tabla 5.14 que muestra los efectos de cada parámetro y su porcentaje de contribución que afecta al método analítico.

Tabla 5.14. Resumen de los efectos por cada parámetro y su valor crítico ( $\sqrt{2}S$ )

PARÁMETROS	EFEECTO	% CONTRIBUCIÓN DEL EFECTO
Temperatura de la columna	1,02	15,60
% Metanol (fase móvil)	0,36	5,50
Longitud de onda	2,11	32,37
Flujo	0,39	5,90
Volumen de inyección	0,09	1,31
Exposición a luz	1,98	30,27
Adición de BHT	0,59	9,05
$\sqrt{2}S_R$	0,40	

$S_R$ : Desviación estándar de precisión intermedia del método

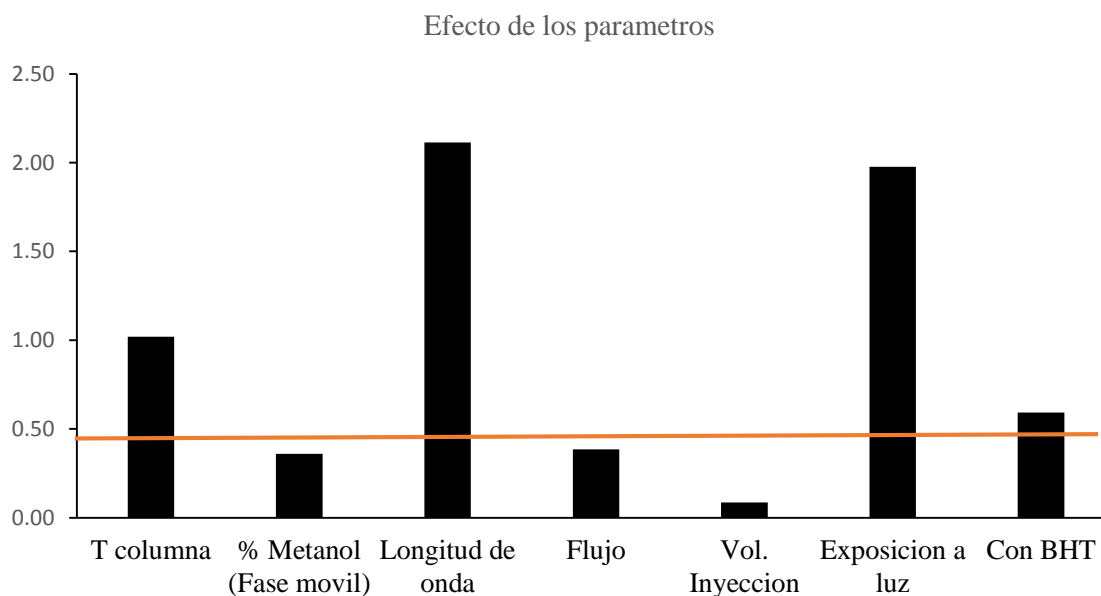


Figura 5.9. Efecto de los parámetros en el método analítico

Como criterio de aceptación para la robustez del método se considera que el efecto no sea superior a  $\sqrt{2}$  veces la desviación estándar de precisión intermedia ( $S_R$ ). (AOAC, 2002).

La Figura 5.9 muestra que los parámetros más robustos son el % Metanol (Fase móvil), el flujo y el volumen de inyección.

Sin embargo la metodología analítica no es robusta ante la presencia de pequeños cambios en los siguientes factores críticos o parámetros más sensibles:

La Temperatura de la columna afecta el orden de elución permitiendo trabajar a velocidades de flujo más altas debido a la reducción de la viscosidad en la fase móvil, pero afecta en la resolución de la separación cromatográfica.

El cambio de la longitud de onda presenta una disminución del tamaño de los picos cromatográficos dando lugar a una engañosa cuantificación.

La exposición a la luz produciendo cambios en la concentración debido al proceso de oxidación y degradación del carotenoide All-*trans*- $\beta$ -caroteno.

La adición del antioxidante BHT (Butilhidroxitolueno) también es un parámetro relativamente pero no tan crítico como los mencionados anteriormente, ya que no hay mucha variación en la respuesta de la señal del método analítico.

## **5.7 INCERTIDUMBRE DEL ANÁLISIS:**

Se realizó una estimación preliminar de la contribución de cada componente o combinación de componentes en la incertidumbre y además aquellos factores que no fueron significativos fueron eliminados.

Las contribuciones a la incertidumbre se expresaron como desviaciones estándar, y se combinaron según las reglas apropiadas, para obtener una incertidumbre estándar combinada.

El factor de cobertura usado para multiplicar la incertidumbre combinada estándar con el propósito de obtener una incertidumbre expandida presenta el valor de 2 para una distribución normal al 95% de confianza.

### **5.7.1. Modelo Matemático**

La expresión matemática que relaciona las magnitudes de entrada con la concentración del carotenoide estudiado All-*trans*- $\beta$ -caroteno (mensurando) se muestra en la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu g}{g} (\text{All-trans-}\beta\text{-caroteno}) = \frac{C_o * V_{ext} * rep}{m * Rec} \dots\dots (31)$$

Donde:

$C_o$  = Concentración de la muestra obtenida a partir de la curva de calibración ( $\mu\text{g/mL}$ )

$V_{ext}$  = Volumen total de la muestra (mL)

$m$  = Masa de la muestra (g)

Rec= Porcentaje de recuperación

rep= Factor adimensional de repetibilidad

### 5.7.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre:

La identificación de las fuentes de incertidumbre significativas parten de un modelo matemático correspondiente a la ecuación (31), así como de aquellas fuentes que no están descritas explícitamente en el modelo y que provienen de otras fuentes, estas fuentes se pueden apreciar en el diagrama de causa y efecto (Ishikawa) en la Figura 5.11 (BIPM, 2008).

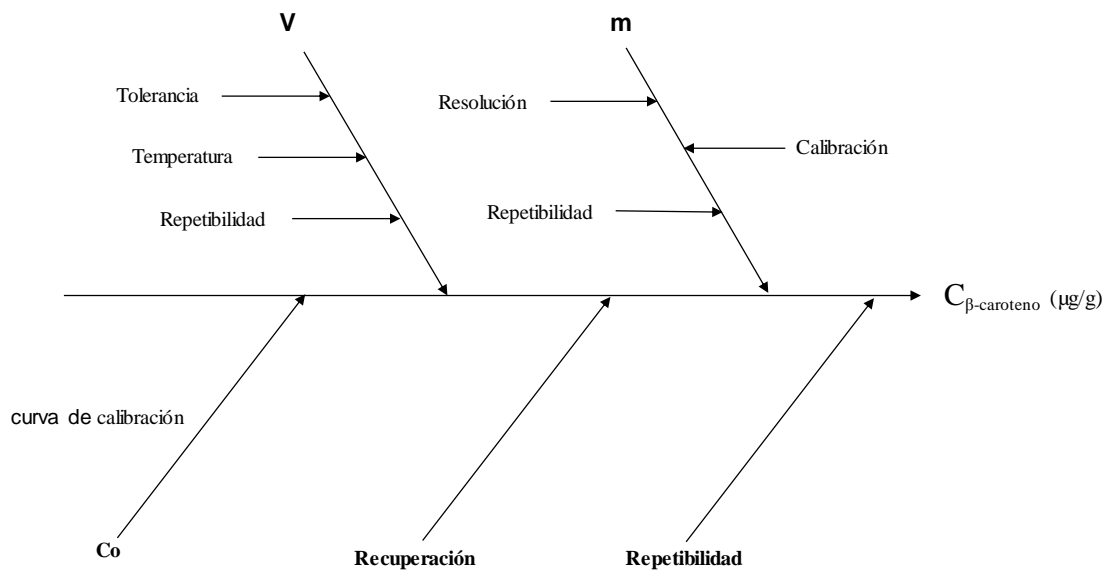


Figura 5.10. Fuentes de incertidumbre en la determinación del carotenoide All-trans- $\beta$ -caroteno en la muestra de *Arthrospira platensis*

La Figura 5.10 muestra las fuentes potenciales de incertidumbre que podrían contribuir en la determinación de la concentración del All-*trans*-β-caroteno (mensurando).

### 5.7.3. Evaluación de las fuentes de incertidumbre $u_{(xi)}$ :

La evaluación de las fuentes de incertidumbre se muestra a continuación:

**5.7.3.1 Incertidumbre debido al pesaje de la muestra *Arthrospira platensis* (m):** El peso de biomasa seca fue de 6 g y se tomaron en cuenta 3 fuentes de incertidumbre: (Maroto, Boqué, Riu, & Rius, 2002)

**a) Calibración de la balanza:** Esta incertidumbre está asociada a la corrección calculada durante la calibración de la balanza, donde se utiliza la información obtenida en el certificado de calibración. El cálculo de la incertidumbre de calibración de la balanza se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$u_{(calibración)} = \sqrt{\left(\frac{U_{(ci)}}{2}\right)^2 + c_i^2} \dots\dots (32)$$

Donde:

$U_{(ci)}$  = Incertidumbre expandida de medición

$c_i$  = corrección obtenida del certificado de calibración

El certificado de calibración de la balanza Sartorius empleada en las pruebas de validación establece que la incertidumbre expandida de medición en gramos con un factor de cobertura  $k$  igual a 2 es:

$$U_{(ci)} = 2\sqrt{1,8 \times 10^{-8} + 4,6 \times 10^{-11} * R^2} \text{ g} \dots\dots (33)$$

Dónde  $R^2$ : Lectura de la balanza después de la calibración (g)

Este tipo de información permite obtener la incertidumbre estándar tipo B, ya que se refiere a datos de un certificado de calibración y no a datos experimentales. (COVENIN, 2000)

Reemplazando el peso de biomasa seca (6,00038 g) utilizado en las pruebas de validación en la ecuación (33) se obtiene:

$$U_{(ci)} = 2\sqrt{1,8 \times 10^{-8} + 4,6 \times 10^{-11} \times (6,00038)^2} \text{ g} = 0,0002804 \text{ g} = 0,2804 \text{ mg}$$

Además la corrección  $c_i$  del certificado de calibración presenta un valor de 0,0000 mg, y de acuerdo a la ecuación (32) al reemplazar los valores se obtiene la desviación estándar de calibración  $u_{(calibración)}$

$$u_{(calibración)} = \sqrt{\left(\frac{0,2804}{2}\right)^2 + 0,0000^2} = \mathbf{0,140 \text{ mg}}$$

**b) Medida de la masa:** Esta incertidumbre depende de la precisión (condiciones en las cuales se realizó la medida) y la resolución de la balanza. El cálculo de la incertidumbre de calibración se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$u_{(medida)} = \sqrt{s(\bar{m}_i)^2 + \frac{res^2}{3}} \dots\dots (34)$$

Donde:

$s(\bar{m}_i)$  = Desviación estándar media o incertidumbre estándar de repetibilidad

res = resolución de la balanza

La resolución de la balanza utilizada en la prueba de validación presenta un valor de resolución (res) de 0,01 mg obtenido en las especificaciones de fábrica.

Además se calculó la repetibilidad pesando 10 veces la pesa patrón clase E2 de 10 g como se muestra en la tabla 5.15.



Tabla 5.15. Repetibilidad del pesaje del peso patrón de 10 g con intervalo de 5 segundos

N° de Lectura	Fecha de pesaje	Lectura de la pesa patrón (g)
1	29/10/2015	10,00005
2	29/10/2015	10,00004
3	29/10/2015	10,00001
4	29/10/2015	10,00003
5	29/10/2015	10,00000
6	29/10/2015	10,00002
7	29/10/2015	10,00003
8	29/10/2015	10,00004
9	29/10/2015	10,00001
10	29/10/2015	10,00002
Promedio		10,00003
Desviación estándar		1,5811 x 10 <sup>-5</sup>

El cálculo de la incertidumbre estándar de repetibilidad  $u_{rep}$  (Incertidumbre tipo A) surge del análisis estadístico de una serie de observaciones (COVENIN, 2000) y se calcula mediante la siguiente fórmula: (NMKL N° 5, 2005)

$$u_{rep} = \frac{s_{rep}}{\sqrt{n}} \dots\dots (35)$$

Donde:

$u_{rep}$  = Incertidumbre estándar de repetibilidad

$s_{rep}$  = Desviación estándar de repetibilidad

n = Número de lecturas

Calculando la incertidumbre estándar de repetibilidad de acuerdo a la ecuación (35) con los resultados obtenidos en la Tabla 5.17 se obtiene:

$$u_{rep} = \frac{1,5811 \times 10^{-5}}{\sqrt{10}} = 5 \times 10^{-6} g = 0,005 mg$$

Reemplazando la incertidumbre estándar de repetibilidad  $u_{rep}$  y el valor de resolución de la balanza en la ecuación (34) se obtiene:

$$u_{(medida)} = \sqrt{0,005^2 + \frac{0,01^2}{3}} = \mathbf{0,006 mg}$$

**c) Deriva de la balanza:** Esta incertidumbre considera dos componentes: la incertidumbre debida a que la balanza cuando se va descalibrando en el paso del tiempo, y la incertidumbre asociada al error sistemático debido a la diferencia entre la temperatura que se calibra la balanza (20°C) y la temperatura de trabajo.

En este caso no se consideró dicha fuente de incertidumbre ya que la balanza es nueva y no presenta una descalibración en el tiempo.

La incertidumbre estándar combinada para el pesaje de la muestra se calcula mediante la siguiente expresión (EURACHEM, 2012):

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 * u(x_i)^2} \dots \dots (36)$$

Donde:

$u_c(y(x_1, x_2, \dots))$  = Incertidumbre estándar combinada

$u_{(x_i)}$  = Incertidumbre estándar evaluada

$c_i$  = Coeficiente de sensibilidad =  $\left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2$

En este caso las variables no se encuentran correlacionadas por lo tanto el coeficiente de sensibilidad  $c_i$  es igual a 1, y al reemplazar los valores de incertidumbre debida a la calibración y medida de la masa en la ecuación (36) se obtiene la incertidumbre estándar combinada de la masa  $u_c(m)$ :

$$u_c(m) = \sqrt{(0,140)^2 + (0,006)^2} = \mathbf{0,1432 mg = 0,0001432 g}$$

**5.7.3.2 Incertidumbre del Volumen usado (V):** El volumen final de solución preparada fue de 250 mL en un matraz volumétrico clase A. Para material volumétrico sin graduación existen tres fuentes de incertidumbre. (EURACHEM, 2012)

**a) Tolerancia:** (Incertidumbre tipo B) Indicado por el fabricante como  $250 \pm 0,12$  mL calibrado a una temperatura de 20°C.

Teniendo en cuenta que no se expresa un nivel de confianza, se asume una distribución triangular (EURACHEM, 2012), el cálculo de la incertidumbre estándar de la tolerancia se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$u_{(tolerancia)} = \frac{Tolerancia}{\sqrt{6}} \dots\dots (37)$$

Al reemplazar el valor de tolerancia indicado por el fabricante en la ecuación (37) se obtiene que:

$$u_{(tolerancia)} = \frac{0,12}{\sqrt{6}} = \mathbf{0,0489 \text{ mL}}$$

**b) Temperatura:** La calibración del material de vidrio fue realizado a una temperatura de 20°C y la temperatura de trabajo en la prueba de validación fue de 22°C, resultando una variación de temperatura  $\Delta T = 2^\circ\text{C}$ , además teniendo en cuenta que el coeficiente de expansión térmica de la acetona es  $1,5 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  (Tablas y constantes, 2016).

El cálculo de la incertidumbre de la variación de temperatura, asumiendo una distribución rectangular (EURACHEM, 2012) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$u_{(\Delta T)} = \frac{V_{mat.vol} * \Delta T * \text{Coeficiente de expansión térmica de la acetona}}{\sqrt{3}} \dots\dots (38)$$

Donde:

$V_{mat.vol}$ : Volumen del material volumétrico

$\Delta T$ : Variación de temperatura

Al reemplazar los valores del volumen del matraz volumétrico, variación de temperatura y coeficiente de expansión térmica de la acetona en la ecuación (38) se obtiene que:

$$u_{(\Delta T)} = \frac{250 * 2 * 1,5 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = \mathbf{0,0433 \text{ mL}}$$

**c) Repetibilidad:** La incertidumbre estándar de repetibilidad es debido a la variación del aforo, para ello se utilizó el método gravimétrico de verificación del material de vidrio en donde se realizaron 10 mediciones (ver Tabla 5.16). Esta incertidumbre es de tipo A ya que surge del análisis estadístico de una serie de observaciones (COVENIN, 2000).

Tabla 5.16. Repetibilidad del pesaje del matraz volumétrico de 250 mL con intervalo de 5 segundos

N° de lectura	Fecha de pesaje	Volumen (mL)
1	30/10/2015	249,93029
2	30/10/2015	249,91988
3	30/10/2015	249,88816
4	30/10/2015	249,89521
5	30/10/2015	249,89945
6	30/10/2015	249,94833
7	30/10/2015	249,94029
8	30/10/2015	249,89981
9	30/10/2015	249,89872
10	30/10/2015	249,89825
Promedio		249,91184
Desviación estándar		0,02118

El cálculo de la incertidumbre estándar de repetibilidad ( $u_{rep}$ ) se calcula de acuerdo a la ecuación (35)

$$u_{rep} = \frac{0,02118}{\sqrt{10}} = \mathbf{0,0067 \text{ mL}}$$

La incertidumbre estándar combinada para el pesaje de la muestra se calcula de acuerdo a la ecuación (36), pero en este caso las variables no se encuentran correlacionadas por lo tanto el coeficiente de sensibilidad  $c_i$  es 1, y al reemplazar los valores de incertidumbre debida a la

tolerancia, variación de temperatura y repetibilidad en la ecuación (36) se obtiene la incertidumbre estándar combinada del volumen de medición  $u_{c(v)}$ :

$$u_{c(v)} = \sqrt{(0,0489)^2 + (0,0606)^2 + (0,0067)^2} = \mathbf{0,0657 mL}$$

**5.7.3.3 Incertidumbre estándar de la curva de calibración ( $C_0$ ):** La incertidumbre de la curva de calibración refleja la incertidumbre debida a la señal y no a la incertidumbre de los estándares de calibración ni correlaciones inducidos por dilución sucesiva de la misma población. (EURACHEM, 2012).

La incertidumbre estándar de la curva de calibración es de tipo A y se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación: (Sadeghi, Navidpour, Bayat, & Afshar, 2013)

$$u_{C_0} = \frac{s(r)}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{Y}_0 - \bar{Y})^2}{m^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots (39)$$

$$s(r) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - mx_i - b)^2}{n-2}} \dots\dots (40)$$

Donde:

$s(r)$ : Desviación estándar residual regresión lineal.

$m$ : Pendiente de la curva de calibración.

$N$ : Número de mediciones para la determinación de  $C_0$ .

$n$ : Número de mediciones de la curva de calibración.

$\bar{Y}_0$ : Concentración de la muestra.

$\bar{Y}$ : Concentración promedio de los estándares.

$b$ : Intercepto de la curva de calibración.

$x_i$ : Concentraciones del estándar  $i$ .

$\bar{x}$ : Concentración promedio de los estándares.

Para el cálculo de la incertidumbre de calibración, se utilizaron los datos obtenidos en la prueba de Linealidad en el rango de 10 – 60  $\mu\text{g/mL}$ , tal como se muestra en la Tabla 5.17.

Tabla 5.17. Resultados de la curva de calibración obtenida en la prueba de validación

Concentración All-trans-β-caroteno (µg/ml)	Relación de áreas 1	Relación de áreas 2	Relación de áreas 3
10	0,611	0,589	0,596
20	1,312	1,309	1,324
30	2,143	2,137	2,146
40	3,025	3,041	3,051
50	3,897	3,905	3,900
60	4,654	4,658	4,650

La ecuación de regresión obtenida a partir de la Tabla 5.17 es:

$$\text{Relación de Áreas} = 0,0827 * [\text{Concentración}] - 0,2848$$

Donde  $m = 0,0827$ ,  $b = -0,2848$  para un número de mediciones totales  $n = 18$  y una concentración promedio de los estándares ( $\bar{Y} = 35 \mu\text{g/mL}$ ).

Reemplazando los resultados obtenidos de la curva de calibración en la ecuación (40) se obtiene:

$$s(r) = 0,0487$$

Además se realizó el análisis por duplicado ( $N=2$ ) de la muestra de *Arthrospira platensis* preparado en la prueba de validación obteniéndose una concentración promedio de  $19,607 \mu\text{g/mL}$ .

Al reemplazar los valores obtenidos en la ecuación (39) se obtiene:

$$u_{Co} = \frac{0,0487}{0,0827} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{18} + \frac{(19,607-35)^2}{5250}} = \mathbf{0,4571 \mu\text{g/mL}}$$

**5.7.3.4 Incertidumbre de la repetibilidad:** (Incertidumbre tipo A), la validación del método analítico presentó un valor RSDr de 0.0101 (Desviación estándar de relativa en condiciones de repetibilidad).

Este valor se utilizó directamente para el cálculo de la incertidumbre estándar combinada asociado con los diferentes términos de repetibilidad (EURACHEM, 2012).

$$u_{rep} = 0,0101$$

**5.7.3.5 Incertidumbre de la Recuperación:** (Incertidumbre tipo A), la veracidad del método analítico se determinó utilizando muestras enriquecidas al 25 ,50 y 75% del valor esperado.

La incertidumbre estándar debida a la recuperación se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación (NMKL N° 5, 2005):

$$u_{(recuperación)} = \frac{RSD (\%)}{\sqrt{n}} \dots\dots (41)$$

Donde:

RSD (%): Desviación estándar residual de las recuperaciones en todos los niveles

n: Número de recuperaciones totales

Los resultados de la Prueba de Recuperación se muestran en la Tabla 5.8 obteniendo como resultados: RSD (%)= 3,0 y n = 9

Reemplazando en la ecuación (41) se obtiene la incertidumbre estándar de recuperación:

$$u_{(recuperación)} = \frac{0,030}{\sqrt{9}} = 0,01$$

Además se realizó el test estadístico t Student comparando el  $t_{exp}$  con el  $t_{tabla}$  para (n-1 grados, 2 colas,  $\alpha=0,05$ ) para determinar si la recuperación media es significativamente diferente de 1.

Si el  $t_{exp}$  resulta mayor o igual que el  $t_{tabla}$  la recuperación es significativamente diferente de 1.

La ecuación para calcular el  $t_{exp}$  es la siguiente: (NordVal , 2010) (EURACHEM, 2012)

$$t_{exp} = \frac{|1-\overline{Rec}|}{u(\overline{Rec})} \dots\dots (42)$$

Reemplazando los valores obtenidos en la prueba de recuperación y reemplazando en la ecuación (42) se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|1-0,983|}{0,01} = 1,68$$

De acuerdo con el resultado obtenido el  $t_{exp}$  es menor al  $t_{tabla} = 2,30$  ( $\alpha = 0.05$ , 8 grados de libertad) por lo que la recuperación no es significativamente diferente de 1 y por lo tanto no necesariamente se debe incluir el factor de corrección (1/Rec) en la ecuación para la cuantificación del carotenoide *All-trans-β-caroteno*.

**5.7.4. Evaluación de la incertidumbre estándar combinada:** Para calcular la incertidumbre estándar combinada se utilizó la ecuación (36) donde  $u(x_i)$  es la incertidumbre estándar evaluada y  $(c_i)$  es el coeficiente de sensibilidad calculada como una derivada parcial  $\partial f/\partial x_i$  para cada magnitud de entrada, que establece la consistencia dimensional de cada incertidumbre estándar para obtener las unidades del mensurando ( $\mu\text{g/g}$ ) (Schmid & Lazos Martínez, 2000).

Tabla 5.18. Valores de la determinación de *All-trans-β-caroteno* en la microalga *Arthrospira platensis* y sus incertidumbres

Magnitud de entrada	Descripción	Valor $x_i$	Incertidumbre Estándar $u(x_i)$
$C_o$	Concentración obtenida a partir de la curva de calibración	19,607 $\mu\text{g/mL}$	0,4571 $\mu\text{g/mL}$
$m$	Masa de la muestra de <i>Arthrospira platensis</i>	6,00038 g	0,000143 g
$V_{ext}$	Volumen total de extracción	250 mL	0,0657 mL
rep	Factor de repetibilidad	1	0,0101
Rec	Recuperación de muestras fortificadas	0,983	0,01



La tabla 5.18 muestra un resumen con los valores para la cuantificación del carotenoide All-*trans*-β-caroteno presente en la microalga *Arthrospira platensis* y sus incertidumbres estándar de cada una de las magnitudes de entrada.

El valor del mensurando se calcula reemplazando los valores de las magnitudes de entrada en la ecuación (31):

$$\frac{\mu g}{g} (\beta\text{-caroteno}) = \frac{19,607 \mu g/mL * 250 mL * 1}{6,00038 g * 0,983} = 831,0370 \frac{\mu g}{g} (\beta\text{-caroteno}) = 0,8310 \frac{mg}{g} (\beta\text{-caroteno})$$

Luego se calculó los coeficientes de sensibilidad para cada una de las magnitudes de entrada:

$$C_{C_o} = \frac{\partial(\frac{C_o * V_{ext} * rep}{m * Rec})}{\partial C_o} = \frac{V_{ext} * rep}{m * Rec} = \frac{250 * 1}{6 * 0,983} = 42,387$$

$$C_m = \frac{\partial(\frac{C_o * V_{ext} * rep}{m * Rec})}{\partial m} = -\frac{C_o * V_{ext} * rep}{m^2 * Rec} = -\frac{19,607 * 250 * 1}{6^2 * 0,983} = -138,514$$

$$C_{V_{ext}} = \frac{\partial(\frac{C_o * V_{ext} * rep}{m * Rec})}{\partial V_{ext}} = \frac{C_o * rep}{m * Rec} = \frac{19,607 * 1}{6 * 0,983} = 3,324$$

$$C_{rep} = \frac{\partial(\frac{C_o * V_{ext} * rep}{m * Rec})}{\partial rep} = \frac{C_o * V_{ext}}{m * Rec} = \frac{19,607 * 250}{6 * 0,983} = 831,086$$

$$C_{Rec} = \frac{\partial(\frac{C_o * V_{ext} * rep}{m * Rec})}{\partial Rec} = -\frac{C_o * V_{ext} * rep}{m * Rec^2} = -\frac{19,607 * 250 * 1}{6 * 0,983^2} = -845,459$$

Tabla 5.19. Coeficientes de sensibilidad de las magnitudes de entrada y su contribución

Magnitud de entrada	Incertidumbre Estándar $u_{(xi)}$	Coficiente de Sensibilidad $c_i$	Contribución $ c_i * u_{(xi)} $	Contribución (%)
$C_o$	0,4571 $\mu g/mL$	42,387	19,3751	53.08%
$m$	0,000143 g	-138,514	0,01943	0.05%
$V_{ext}$	0,0657 mL	3,324	0,21838	0.60%
$rep$	0,0101	831,086	8,39396	23.02%
$Rec$	0,01	- 845,459	8.45459	23.19%

Luego se procedió a calcular la incertidumbre estándar combinada reemplazando los valores de los coeficientes de sensibilidad y las incertidumbres estándares de cada magnitud de entrada en la ecuación (36):

$$u_{c(\beta\text{-caroteno})} = \sqrt{C_{C_o}^2 * u^2(C_o) + C_m^2 * u^2(m) + C_v^2 * u^2(V_{ext}) + C_{rep}^2 * u^2(rep) + C_{Rec}^2 * u^2(Rec)}$$

$$u_{c(\beta\text{-caroteno})} =$$

$$\sqrt{42,387^2 * 0,4571^2 + (-138,514)^2 * 0,000143^2 + 3,324^2 * 0,0657^2 + 831,086^2 * 0,0101^2 + (-845,459)^2 * 0,01^2}$$

$$u_{c(\beta\text{-caroteno})} = 22,7447 \mu\text{g/g} = 0,02274 \text{ mg/g}$$

#### 5.7.5. Estimación de la incertidumbre expandida Ue:

El valor de la incertidumbre expandida global se obtiene al multiplicar la incertidumbre estándar combinada  $u_c(y)$  por un factor de cobertura  $k$ , por lo tanto el resultado de la medición se expresa convenientemente como  $Y = y \pm U$  (COVENIN, 2000).

Se requiere que la incertidumbre expandida pueda establecer un intervalo que abarque una gran fracción de la distribución de los valores que se pueden atribuir razonablemente a la magnitud a medir o mensurando. (GUM, 2012)

Para este estudio el factor de cobertura ( $k$ ) es igual a 2 a un nivel de confianza del 95% (EURACHEM, 2012).

En algunos casos pueden existir mayores exigencias en cuanto al valor del factor de cobertura utilizado para obtener la incertidumbre expandida, pudiéndose solicitar o requerir un factor de cobertura  $k = 3$ , a fin de entregar un 99,7% de confianza, esto generalmente se puede requerir frente a determinados contaminantes o residuos. (Instituto de Salud Pública, 2010)

Reemplazando la incertidumbre estándar combinada en la ecuación (10) se obtiene la incertidumbre expandida:

$$U = 2 * 22,7447 \mu\text{g/g} = 45,4895 \mu\text{g/g} = 0,0454 \text{ mg/g}$$

Para reportar la incertidumbre se expresa como máximo con dos cifras significativas (y redondeo hacia arriba), y el valor de la concentración se expresa con las mismas cifras decimales que su incertidumbre, con lo cual el valor del mensurando debe reportarse como: (Alzate Rodriguez, 2008)

$$\text{Concentración}_{(\text{All-trans-}\beta\text{-caroteno})} = (0,831 \pm 0,045) \frac{\text{mg All-trans-}\beta\text{-caroteno}}{\text{g muestra}}$$

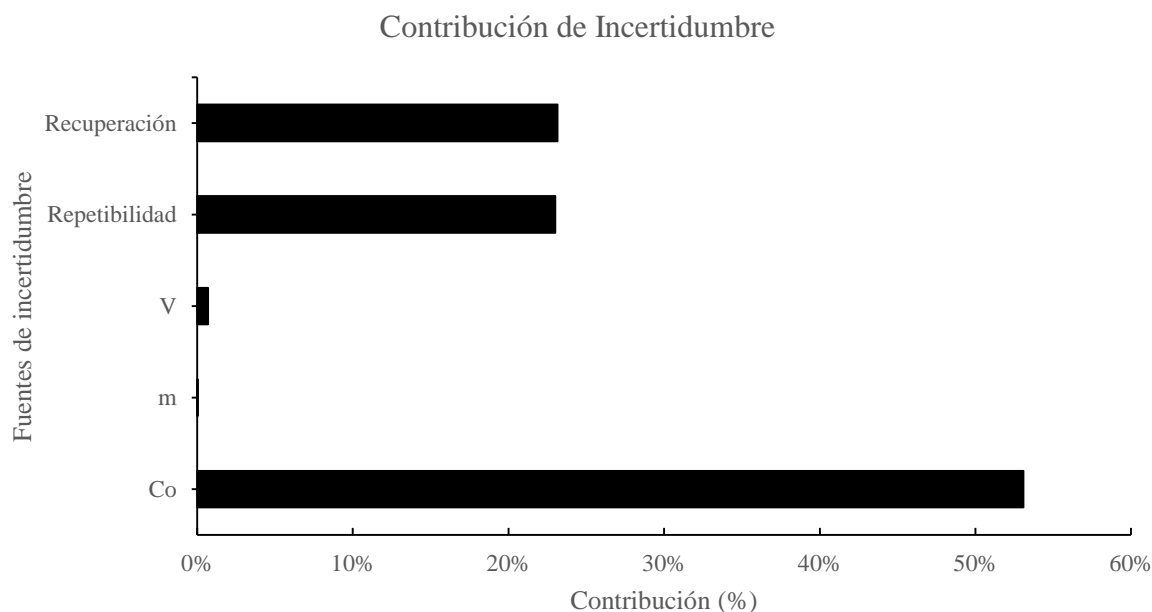


Figura 5.11. Contribuciones de incertidumbre del método analítico

La estimación de la incertidumbre en el análisis químico es muy relevante dentro de la administración de los recursos de un laboratorio de control de ensayo, porque conocer la incertidumbre del método analítico proporciona un enorme valor en la calidad de los productos certificados, y la trazabilidad del resultado.

La Figura 5.11 muestra que los componentes de la incertidumbre debida a la masa y al volumen fueron pequeñas y sus contribuciones fueron 0,05% y 0,71%, esto se debe al correcto pesaje de la muestra y calibración de la balanza, además del empleo de material volumétrico clase A de alta precisión para el aforo de la solución.

Las contribuciones debidas a la repetibilidad y recuperación muestran un aporte a la incertidumbre del 23% y 23,16%, esto se debe a errores aleatorios en el proceso de medición y una forma de disminuir su contribución es incrementando el número de observaciones o réplicas en la medición. Además mantener un sistema de aseguramiento de la calidad para que el laboratorio pueda asegurar que sus resultados siguen siendo trazables y que sigue siendo válido la incertidumbre calculada (Maroto, Boqué, Riu, & Rius, 2002).

El mayor aporte a la incertidumbre corresponde a la incertidumbre estándar debido a la curva de calibración  $u_{Co}$  con una contribución del 53,08%, esto se debe principalmente a la construcción de la curva de calibración que involucra varios procesos de dilución, introduciendo más errores en la medición y por ende un aumento en la contribución de la incertidumbre.

La estimación de la incertidumbre en este estudio ha proporcionado una gran comprensión de cómo un resultado de la medición puede verse afectada por diferentes parámetros: La medición de volúmenes, masas y construcción de curvas de calibración; todos tienen un efecto sobre la eficiencia de la extracción.

Por otra parte, el contenido del carotenoide *All-trans- $\beta$ -caroteno* en la muestra de microalga *Arthrospira platensis* fue 0,831 mg/g encontrándose dentro del rango de composición química de la microalga [0,7-1,7 mg/g] (ver Tabla 2.1) según (Falquet, 2012). Otra referencia indicaría que el contenido del carotenoide *All-trans- $\beta$ -caroteno* presente en la microalga *Arthrospira platensis* es 0,90 mg/g (Tang & Suter, 2011), encontrándose cerca al valor reportado, esto indicaría una eficaz extracción del carotenoide en la microalga, justificando que el método validado es el adecuado para su uso previsto.

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

---

- Se validó la metodología analítica propuesta por Van Heukelem & Thomas para la cuantificación del carotenoide *All-trans-β-caroteno* en la microalga *Arthrospira platensis* por cromatografía líquida de alta resolución con la finalidad de implementarlo en diferentes laboratorios pertenecientes a la industria alimentaria.
- Los parámetros característicos obtenidos fueron la selectividad donde no se reportó ninguna presencia de interferentes; la linealidad presentó un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,999; el límite de detección fue 1,96  $\mu\text{g/mL}$ ; el límite de cuantificación fue 6,49  $\mu\text{g/mL}$ ; el porcentaje de recuperación fue 98,03% encontrándose dentro del intervalo de aceptación 80-110%; la precisión en condiciones de repetibilidad, presentó valores RSD de 0,41% para la respuesta del equipo y 1,01% para el método analítico; la precisión intermedia presentó un valor de RSD 1,43% menor al RSD de Horwitz cumpliendo el criterio de aceptación; la robustez demostró que el método analítico es muy sensible al cambio de temperatura de la columna, longitud de onda y exposición a la luz ; y la incertidumbre expandida presentó un valor de 45,49  $\mu\text{g/mL}$ , siendo la fuente de incertidumbre debida a la curva de calibración  $u_{C_0}$  el que presentó una mayor contribución 53,08%.
- El metodología analítica de extracción validada cumplió con los criterios de aceptación establecidos de acuerdo a normas internacionales, y se ha considerado como una alternativa para la cuantificación del carotenoide *All-trans-β-caroteno* en la microalga *Arthrospira platensis*.
- El contenido de *All-trans-β-caroteno* presente en la microalga *Arthrospira platensis* fue de  $(0,831 \pm 0,045)$  mg/g.

## RECOMENDACIONES

---

- Evaluar el método analítico propuesto en diferentes tipos de microalgas que contienen  $\beta$ -caroteno como por ejemplo la microalga *Dunaliella salina* y elaborar estudios sobre el uso potencial de carotenoides para la elaboración de suplementos alimenticios y multivitamínicos en la industria alimentaria.
- Utilizar la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas HPLC-MS, debido a su alta sensibilidad y suministro de información del ion molecular con posibles fragmentaciones que contribuyen a la determinación de la estructura del carotenoide y sus respectivos isómeros.

## GLOSARIO

---

**BANCO DE GERMOPLASMA:** Es un área destinado a la conservación de la diversidad genética de uno o varios cultivos y sus especies silvestres relacionadas.

**BIOMASA:** Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

**CALIBRACIÓN:** Conjunto de operaciones que establecen bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición.

**CIANOBACTERIA:** Organismos que se caracterizan por conjugar el proceso de la fotosíntesis oxigénica con una estructura celular típicamente bacteriana.

**COSECHA DE MICROALGAS:** Es la separación de la microalga del medio de cultivo.

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** Las especificaciones que son utilizadas para tomar una decisión para aceptar o rechazar un lote de productos o aceptar una pieza de equipamiento que ha sido calificada.

**LIOFILIZACIÓN:** Es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación.

**MEDIO DE CULTIVO:** Consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

**MICROALGA:** Microorganismos microscópicos fotosintéticos que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AEAS. (2012). Guía par el funcionamiento de los laboratorios de ensayo de agua parte II criterios para la validación de métodos de ensayo físico-químicos y microbiológicos. España: Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento.
- AEFI. (2001). Validación de Métodos Analíticos. España: Asociación Española de farmaceiticos de la industria.
- Aguirre Capelo, E. (2013). Validación del método analítico por espectrofotometría de absorción atómica para la determinación de Ba, Co, y V en suelos. Quito.
- Alzate Rodriguez, E. J. (2008). Estimación de la incertidumbre de medición en el ensayo de alcalinidad de acuerdo a la guía GTC 51. ISSN 0122-1701, 375-380.
- AOAC. (2002). Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods dor Dietary Supplements and Botanicals. 1-38.
- BIPM. (2008). Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement. JCGM , 1-134.
- Boque, R., Maroto, A., Riu, J., & Rius , X. (2002). Validation of Analytical Methods. Grasas y Aceites Vol. 53. Fasc. 1, 128-143.
- Buttori, D., & Di Ruscio, N. (2009). Microalga *Spirulina* (*Arthrospira*).
- Codex Alimentarius Commision. (2010). Procedural Manual Nineteenth edition. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 1-392.
- Colman Martínez, M., Martínez Huélamo, M., Miralles, E., Estruch, R., & Lamuela Raventós, R. M. (2016). A New Method to Simultaneously Quantify the Antioxidants: Carotenes, Xanthophylls, and Vitamin A in Human Plasma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-10.
- COVENIN. (2000). Guía para la expresión de la incertidumbre en las mediciones. FONDONORMA, 1-130.



- Da Costa Cesar, I., & Pianetti, G. A. (2009). Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol-45,n.2, 235-240.
- Díaz, I., & Cardenas, P. (2015). *Validación de Métodos de Ensayo*. Lima: Instituto de Corrosión y Protección, Universidad Católica del Perú.
- Earthrise Nutritional. (2016). Earthrise Nutritional. Recuperado el 14 de Enero de 2016, de <http://earthrise.com/spirulina/what-is-spirulina/>
- El-Shouny, W., El-Fatah, A., El-Fatah Abomohra, A., & Abo-Eleneen, M. (2015). Production enhancement of some valuable compounds of *Arthrospira platensis*. *Journal of Basic and Environmental Sciences*(2), 74-83.
- EPA. (2014). Inductively coupled plasma-mass spectrometry Method 6020B. SW-846 Update V, 1-33.
- EURACHEM. (2012). *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. CITAC Guide CG 4 Third Edition, 1-141.
- EURACHEM Guide. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1-75.
- Falquet, J. (2012). *The nutritional aspects of spirulina*, Antenna Technologies. (Y. El-Samragy, Ed.) Recuperado el 10 de Enero de 2016, de [http://www.antenna.ch/en/documents/AspectNut\\_UK.pdf](http://www.antenna.ch/en/documents/AspectNut_UK.pdf)
- FAO Soils Bulletin. (1998). *Guidelines for quality management in soil and plant laboratories*. Roma: Natural Resources Management and Environment Department.
- Giraldo Vicente, R. M. (2004). *Optimización del medio de cultivo químico (Zarrouk) de la microalga Spirulina platensis (Nordst.) Gom. (Oscillatoriaceae, CYANOPHYTA)*. Lima.
- Grand View Research. (11 de Enero de 2017). *Beta-Carotene Market Analysis By Source (Algae, Fruits & Vegetables, & Synthetic), By Application (Food & Beverages, Dietary*

- Supplements, Cosmetics, & Animal Feed) And Segment Forecasts To 2024. Obtenido de <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/beta-carotene-market>
- GUM. (2012). Estimación de incertidumbres Guía GUM. Revista Española de Metrología, 114-130.
- Hidalgo Colmenares, K. (2011). Validación de métodos de ensayo para análisis de gases en Praxair, S.C.A . Sartenejas.
- Huck, C. W., Popp, M., Scherz, H., & Bonn, G. K. (2000). Development and Evaluation of a New Method for the Determination of the Carotenoid Content in Selected Determination of the Carotenoid Content in Selected Vegetables by HPLC and HPLC–MS–MS. Journal of Chromatographic, 442-449.
- ICH. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). London: European Medicines Agency.
- INACAL. (9 de Enero de 2016). Guia para efectuar Validación de Métodos de Ensayos. Obtenido de <http://www.inacal.gob.pe/inacal/images/docs/acreditacion/requisitos-para-solicitar-acreditacion/laborarios-ensayo-calibracion/guiaValidacion.pdf>
- Instituto de Salud Pública. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. 1-67.
- ISO 5725-1. (1994). ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 1 : General principles and definitions. Geneve: ISO.
- ISO 5725-2. (1994). Exactitud (Veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 2: Método básico para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método estándar de medición. COVENIN, 1-41.
- Jing, C., Qun, X., & Rohrer, J. (2012). HPLC Separation of All-Trans- $\beta$ -Carotene and Its Iodine-Induced Isomers Using a C30 Column. Thermo Fisher Scientific Inc(187), 1-5.
- Jurado, J. M. (2008). Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos. Departamento de Química Analítica, 1-47.

- Kargin Yilmaz, H. (2012). The proximate composition and growth *Spirulina platensis* biomass (*Arthrospira platensis*) at different temperatures. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, XI(8), 1135-1138.
- Mai, H. C., Truong, V., & Debaste, F. (2016). Carotenoids purification from gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) fruit oil. *Journal of Food Engineering*, 172, 2-8.
- Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., & Rius, X. F. (2002). Cálculo de incertidumbre en medidas físicas: medida de una masa. *ISSN Vol. 24, N° 275 (OCT)*, 1-7.
- Martínez Martínez, A. (2003). Carotenoides. Medellín.
- Mercola, J. (2011). Mercola. Recuperado el 17 de Enero de 2016, de <http://espanol.mercola.com/boletin-de-salud/beneficios-de-la-espirulina.aspx>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid: Pearson Educación, S.A Cuarta Edición.
- NATA. (2013). *Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods*. Australia: National Association of Testing Authorities.
- NMKL N° 5. (2005). Estimacion y expresión de la incertidumbre de la medición en análisis químico. *Comité Nórdico de análisis de alimentos*, 1-45.
- NordVal . (2010). *Guide in Validation of Alternative Proprietary Chemical Methods*. NordVal Protocol N°2, 1-15.
- NTP-ISO/IEC 17025. (2005). *Resquisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración*. Instituto Nacional de la Calidad (INACAL), 1-38.
- Oliver, J., & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography*, 543-555.
- OMS. (1998). *Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte: Validación*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- ONA. (2012). *El proceso de validación involucra una serie de etapas que se deben de planificar y de Ensayos y Calibración*. Nicaragua: Oficina Nacional de Acreditación.

- Orozco Chilel, R. M. (2010). Extracción supercrítica y cuantificación HPLC de Luteína y Beta Caroteno presentes en vegetales de consumo popular. Guatemala: FONACYT.
- Perez Hernandez, T., Aldana J, M. I., & Rodriguez, L. I. (2011). Validación de un método para la determinación de  $\beta$ -caroteno en aceite de palma por HPLC con detector UV. 1-8.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 89-100.
- Ramírez Huayhuas, F., & Acosta Castillo, L. E. (2007). Desarrollo y validación prospectiva del método de análisis de valoración de Glimipiride 2mg/ Rosiglitazona 4mg Tabletas recubiertas por Cromatografía líquida de alta performance. 1-99.
- Ramirez Moreno, L., & Olvera Ramirez, R. (2006). Conocimientos acerca del alga (Arthrospira). Venezuela: Interciencia, vol.31 (nº 009).
- Ramirez Moreno, L., & Olvera Ramirez, R. (2006). Uso tradicional y actual de spirulina sp. (Arthrospira sp.). *SciELO*, 31(9), 657-663.
- Rivera, C., & Rodríguez, R. (2014). Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory. 1-7.
- Rodriguez Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Human Nutrition Institute.
- Rodriguez, D. B., & Kimura, M. (2004). HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. Washington: HarvestPlus.
- Ruiloba Rossel, A. (1 de Febrero de 2003). Aprueban Guía para la Validación de métodos de ensayo y las directrices para la implementación y evaluación de métodos de ensayos sensoriales. *Diario El Peruano*, págs. 238363-238366.
- Sadeghi, F., Navidpour, L., Bayat, S., & Afshar, M. (2013). Validation and Uncertainty Estimation of an Ecofriendly and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Diltiazem in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* , 1-10.

- Schmid, W. A., & Lazos Martínez, R. J. (2000). Guía para estimar la incertidumbre de la medición. CENAM, 1-27.
- Scottish Marine and Freshwater Science. (2010). The Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatography Method to Quantify Chlorophylls a and b in Marine Phytoplankton and Identify Other Pigments of Interest. Aberdeen: Marinescotland science ISSN: 2043-7722 Vol. 12.
- Skoog, D. A., Holler, J., & Nieman, T. A. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Madrid: Concepción Fernández Madrid.
- Strati, I. F., Sinanoglou, V. J., Kora, L., Miniadis Meimaroglou, S., & Oreopoulou, V. (2012). Carotenoids from Foods of Plant, Animal and Marine Origin: An Efficient HPLC-DAD Separation Method. Foods ISSN 2304-8158, Vol. 1, 52-65.
- Tablas y constantes. (15 de Enero de 2016). Obtenido de <http://www.galeon.com/profedemateyfisica/tablas.pdf>
- Tang, G., & Suter, P. M. (2011). Vitamin A, Nutrition, and Health Values of Algae: Spirulina, Chlorella, and Dunaliella. Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences, 111-118.
- Tien Lin, J., Chung Lee, Y., Chin Hu, C., Cheng Shen, Y., Jou Lu, F., & Jye Yang, D. (2010). Evaluation of Carotenoid Extract from *Dunaliella salina* against Cadmium-Induced Cytotoxicity and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Induced Expression of Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin with Rat Liver Cell Lines. Journal of Food and Drug Analysis, 18(5), 301-306.
- USA GMP. (2016). Santegra The educated Choice. Recuperado el 18 de Enero de 2016, de <http://www.santegrausa.com/herbal-remedies/spirulina-b12-and-beta-carotene.html>
- Van Heukelem, L., & Thomas, C. S. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. Journal of Chromatography A, 31-49.
- Wang, B., Lin, L., & Chen, W. (2012). Optimization of  $\beta$ -carotene production by a newly isolated *Serratia marcescens* strain. Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458, 1-8.

- Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F., Llewellyn, C. A., Bjornland, T., Repeta, D., & Welschmeyer, N. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine ecology progress series* Vol 77, 183-196.
- Xu Qun, C. J., & Rohrer, J. (2012). HPLC Separation of All-*trans*- $\beta$ -Carotene and Its Iodine-Induced Isomers Using a C30 Column. *Thermo Scientific*, 1-5.
- Yeverino Gutierrez, M. L. (1997). Determinación cuantitativa de carotenoides en hojas de cinco especies del género *leucaena*. Monterrey.

## **ANEXO A**

EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES, MÉTODO DE VAN HEUKELEM & THOMAS

# Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments

Laurie Van Heukelem\*, Crystal S. Thomas

*University of Maryland Center for Environmental Science, Horn Point Laboratory, P.O. Box 775, Cambridge, MD 21613, USA*

Received 29 August 2000; received in revised form 7 November 2000; accepted 10 November 2000

## Abstract

We used chromatography modeling software to assist in HPLC method development, with the goal of enhancing separations through the exclusive use of gradient time and column temperature. We surveyed nine stationary phases for their utility in pigment purification and natural sample analysis. For purification, a complex algal matrix was separated on an efficient monomeric column, from which partially purified fractions were collected and purified on polymeric columns that exaggerated resolution between pigments of interest. Additionally, we feature an HPLC method that is simple, fast, demonstrates excellent transferability and is ideal for quantitative analysis of pigments in dilute natural water samples. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Chromatography modeling software; Stationary phases, LC; Phytoplankton pigments; Carotenoids; Chlorophylls

## 1. Introduction

HPLC methods for the analysis of phytoplankton pigments are used to help assign algal species to phylogenetic divisions, assess phytoplankton abundance and diversity in natural samples [1] and provide information on photosynthetic and photo-protective physiology [2]. However, no one method can resolve all pigments important to these purposes as there are many pigments to separate and as pigment separations are improved, new pigments are often identified. Several approaches have been used to improve pigment separations as recently reviewed by Jeffrey et al. [1]. These approaches have included

the use of ternary solvent systems (using three pumps) [3,4],  $C_{18}$  columns [3–16] and  $C_8$  columns [17–20] and manipulations to column temperature ( $T$ ) [9,13–16,20]. The  $C_{30}$  stationary phase has been useful in the analysis of pigments in food and tissues as recently reviewed [21] and has had limited use thus far in the analysis of phytoplankton pigments [22,23]. A very promising new method which utilizes a pyridine-containing mobile phase and a  $C_8$  column separates many pigments not previously resolved and has been used to identify the elution position of many new pigments [20]. We used an alternative approach to improve separations: the combined use of column  $T$  and gradient time ( $t_G$ ), in conjunction with a simple binary solvent system. Our approach was enabled by method development software.

\*Corresponding author. Fax: +1-410-221-8490.

E-mail address: laurievh@hpl.umces.edu (L. Van Heukelem).



The software selected (DryLab, from LC Resources, Walnut Creek, CA, USA) has been successfully used [24] to optimize separations of 14 different sample types, including the separation of 29 algal pigments. To use this software, retention times ( $t_R$ ) are recorded for a suite of compounds analyzed on the same HPLC column under four chromatographic conditions, including two values each of  $t_G$  and  $T$ . From the observed  $t_R$  values (referred to as input data), the software predicts the  $t_R$  values which would result from hypothetical chromatographic conditions selected by the user (including such things as  $t_G$ , gradient shape, column  $T$ , column dimensions and flow-rate ( $F$ )). The conditions required for optimal separations can then be easily identified.

Our ultimate goals in using this software were to identify methods which would enhance our abilities to isolate pigments as standards from natural sources and to identify a method that would simultaneously separate as many important pigments as possible and be suitable for the routine quantitative analysis of pigments in natural water samples. Additional requirements of this latter method were that it be based on a simple methanol-based binary solvent system, use linear gradients only, have a short analysis time and excellent detectability and be easily transferred to other instruments. We collected pigment  $t_R$  data from nine different columns for use with the simulation software. We used changes to values of  $T$  and  $t_G$  for optimizing conditions as we wanted to see how effectively we could improve separations based exclusively on these two variables.

We identify columns and methods well suited to the isolation of pigments from algal monocultures for use as pigment standards and we introduce a new method where we describe the elution position of 57 algal pigments.

## 2. Experimental

### 2.1. Equipment and software

A Hewlett-Packard (HP, Waldbronn, Germany) series 1100 HPLC system with autoinjector (900  $\mu$ l syringe head), refrigerated autosampler compartment, thermostatted column compartment, quaternary

pump with in-line vacuum degasser, and photo-diode array detector set to monitor 450 and 665 nm (both with 20 nm bandwidths) was used for primary studies. In-line photo-diode array spectra (from 350 to 700 nm) was collected for each pigment (Table 1) and compared with published values [20,25] for pigment identifications. Dwell volume was 3 ml. A Beckman (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) System Gold HPLC was equipped with a dual pump (125 solvent module), photo-diode array detector set to monitor 450 nm, manual injector (200  $\mu$ l loop), and an external column heating device (Eldex Laboratories, Napa, CA, USA). Dwell volume was 2.2 ml.

Chromatography modeling software (DryLab, version 2.05, LC Resources, Walnut Creek, CA, USA) was donated for use. This software requires (for predictions based on simultaneous variation of column  $T$  and  $t_G$ ) retention times gathered from four sets of conditions, referred to as the input data (Table 2, further details in Section 3.1). We used  $t_R$  values for pigments in various algal culture and mutant corn leaf extracts for input data. After developing suitable methods for pigment isolation, we isolated pigments for use as standards and then recombined them into one standard test mixture containing 33 pigments. This mixture was used in subsequent testing.

After the chromatography modeling software was used to generate hypothetical conditions for the best separation, those conditions were implemented on the HPLC. For these analyses, an injector program was used which mixed sample with buffer (28 mM tetrabutyl ammonium acetate (TBAA), pH 6.5) in the sample loop before injection. With the Beckman Gold HPLC and when using large injection volumes (900  $\mu$ l) on the HP HPLC (during pigment isolations), sample was premixed by hand with buffer and then allowed to equilibrate for 5 min before injecting. All samples were equilibrated to the autosampler compartment temperature (5°C) of the HP HPLC before injecting.

### 2.2. Materials

#### 2.2.1. Reagents and solvents

All reagents except ethanol (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) were HPLC grade: methanol (EM Science, Gibbstown, NJ, USA or JT Baker), acetone

Table 1

Pigments, SCOR abbreviations used in the text, code (number or letter) used to identify elution position of pigments in Figs. 2–9 and the pigment sources used to document retention time ( $t_R$ ) values are shown<sup>a</sup>

Code		Pigment name	SCOR [26] WG 78 abbreviation	Source <sup>b</sup>	$t_R$ (min)	$R_s$ (peak code)	Visible absorbance spectra (nm)
1	*	Chlorophyll <i>c</i> 3	chl <i>c</i> 3	C J L N S T	3.88		456, 588 (625)
2		Monovinyl chl <i>c</i> 3	MV chl <i>c</i> 3	J	4.14		448, 585 (626)
3	*	Chlorophyll <i>c</i> 2	chl <i>c</i> 2	A–E H J L–O R–T	5.70	NR 3/4	446, 584, 634
4	*	Mg 3,8-divinyl pheoporphyrin <i>a</i> <sub>5</sub> monomethyl ester	Mg DVP	G P	5.81	NR 4/a	440, 576, 632
a		Unknown	–	K	5.92	NR a/5	–
5	*	Chlorophyll <i>c</i> 1	chl <i>c</i> 1	B D E R	6.05	NR 5/6	442, 580, 634, 668
6		Chlorophyllide <i>a</i>	chl <i>ide a</i>	F H N O	6.06		(390), 434, 620, 668
7	**	Peridinin	perid	A B M	9.32		476
8		Peridinin isomer	–	A B M	9.58		478
b		Unknown	–	P	11.37		456, 476
9	**	19'-Butanoyloxy fucoxanthin	but-fuco	VKI <sup>c</sup> C N S T	12.31		448, 464
c		Unknown	–	G	12.68	NR c/10	458
10	**	Fucoxanthin	fuco	C D E L N R S T	12.63		454
11	**	Neoxanthin	neo	F G P U	13.29	NR 11/12	414, 438, 466
12		4-Keto-19'-hexanoyloxyfucoxanthin	4 k-hex-fuco	J	13.31		448, 470
d		Unknown	–	L	13.73	NR d/13	446, 468
13	**	Prasinolanthin	pras	VKI <sup>c</sup> G P	13.74		462
14	**	Violaxanthin	viola	VKI <sup>c</sup> F G P Q U	13.99	$R_s=1.3, 14/15$	418, 442, 470
15	**	19'-Hexanoyloxy fucoxanthin	hex-fuco	VKI <sup>c</sup> C J L	14.16		(430), 452, 480
16	*	Astaxanthin	asta	shrimp carapace G	14.53		480
e		Unknown	–	P	14.78		466
17		Diadinochrome	diadchr	M	15.02	NR 17/f	(410), 428, 456
f		Unknown	–	J	15.09	NR f/18	448, 470
18		Unknown (myxo-like spectra)	–	K	15.13	NR 18/19	452, 474, 506
19	*	Diadinoxanthin	diadino	A–E J L–N R–T	15.23	$R_s=1.4, 19/20$	(428), 446, 476
20		Dinoxanthin	dino	A M	15.49		416, 440, 470
21	*	Antheraxanthin	anth	F	15.99		(425), 446, 474
22	**	Alloxanthin	allo	H O	16.53		(430), 452, 480
23	*	Diatoxanthin	diato	C D E M R T	17.12	NR 23/24	(430), 454, 480
24		Monadoxanthin	monado	H O	17.22		(422), 444, 472
25	**	Zeaxanthin	zea	C F G I K P Q V	17.79		(430), 452, 478
26	**	Lutein	lut	F G T V	17.98		424, 446, 474
g		Unknown	–	Q	18.24	NR g/h	422, 444, 472
h		Unknown	–	G	18.32		(408), 428, 454
i		Unknown	–	L N S T	18.84		(424), 448, 472
27	**	Canthaxanthin	cantha	W	19.07		480
j		Unknown	–	Q	19.23		422, 444, 472
28	*	Gyroxanthin diester-like 1 [27]	–	C	19.94		(426), 444, 472
29	*	Gyroxanthin diester-like 2 [27]	–	C	21.00		(426), 444, 472
30	*	Divinyl chlorophyll <i>b</i>	DV chl <i>b</i>	U	21.92	$R_s=0.8, 30/31$	478, 608, 654
31	**	Monovinyl chlorophyll <i>b</i>	chl <i>b</i>	Fluka <sup>d</sup> F G P	22.03		468, 602, 652
32		Divinyl chlorophyll <i>b'</i>	DV chl <i>b'</i>	U	22.29		480, 608, 658
33		Crocoxanthin	croco	H O	22.42	NR 33/34	(428), 446, 476
34		Monovinyl chlorophyll <i>b'</i>	chl <i>b'</i>	Fluka <sup>d</sup> F G P	22.50		470, 602, 652
35		Chlorophyll <i>a</i> allomer 1	chl <i>a</i> allom	Fluka <sup>d</sup> A–T	23.30		(390), 432, 620, 666
36		Chlorophyll <i>a</i> allomer 2	chl <i>a</i> allom	Fluka <sup>d</sup> A–T	23.43	NR 36/k	(390), 432, 620, 666
k		Unknown	–	R	23.52	NR k/L	(464–474)
L		Unknown	–	R	23.52	NR L/37	454

Table 1. Continued

Code	Pigment name	SCOR [26] WG 78 abbreviation	Source <sup>b</sup>	$t_R$ (min)	$R_s$ (peak code)	Visible absorbance spectra (nm)
37	Phytylated chlorophyll <i>c</i> -like	phytyl-chl <i>c</i>	J R	23.53		460, 588, 636
38	** Divinyl chlorophyll <i>a</i>	DV chl <i>a</i>	U	23.76		(390), 442, 622, 666
m	Unknown	–	L	23.91	NR m/39	458, 588, 638
39	** Monovinyl chlorophyll <i>a</i>	chl <i>a</i>	Fluka <sup>d</sup> A–T	23.96		(390), 432, 620, 666
40	Divinyl chlorophyll <i>a'</i>	DV chl <i>a'</i>	U	24.13		(386), 440, 622, 666
41	Monovinyl chlorophyll <i>a'</i>	chl <i>a'</i>	Fluka <sup>d</sup> A–T	24.33		(388), 432, 618, 666
n	Unknown	–	P	25.58		(422), 442, 470
42	* $\beta,\epsilon$ -Carotene ( $\alpha$ -carotene) <sup>e</sup>	$\beta,\epsilon$ -car	Sigma <sup>f</sup> G H J L O P S	26.65	NR 42/43	(422), 446, 474
43	* $\beta,\beta$ -Carotene ( $\beta$ -carotene) <sup>d</sup>	$\beta,\beta$ -car	Fluka <sup>d</sup> , A–G, I–N P–U	26.71		(430), 452, 476

<sup>a</sup> Pigments with \* or \*\* were used with all columns ( $t_R$  and  $R_s$  data given are specific to the method described in Section 3.6).  $R_s$  is  $\geq 1.5$  unless otherwise noted (NR =  $R_s < 1.0$ ). Visible absorbance spectra was obtained from the in-line HPLC photo-diode array detector (350–700 nm) (solvent A, 70:30 methanol, 28 mM TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol). Parentheses indicate spectral shoulder.

<sup>b</sup> Sources: Horn Point batch cultures, (A) *Prorocentrum minimum*, (B) *Gyrodinium uncatentum*, (C) *Gyrodinium galatheanum*, (D) *Thalassiosira pseudonana*, (E) *Isochrysis* sp. (TISO strain, CCMP 1324), (F) *Dunaliella tertiolecta* (CCMP 1320), (G) *Pycnococcus provasolii* (CCMP 1203), (H) *Pyrenomonas salina*, (I) *Synechococcus* sp.; CCMP individual cultures, (J) *Emiliania huxleyi* (CCMP 373), (K) *Synechococcus* cf. *elongatus* (CCMP 1629), (L) *Chrysochromulina polyepsis* (CCMP 1757), (M) *Amphidinium carterae* (CCMP 1314), (N) *Pelagococcus subviridis* (CCMP 1429), (O) *Guillardia theta* (CCMP 327), (P) *Micromonas pusilla* (CCMP 1545), (Q) *Nannochloropsis* sp. 1 (CCMP 531), (R) *Isochrysis galbana* (CCMP 1323); all other sources, (S) *Pelagamonas calceolata*, (T) *Aureococcus anophagefferens*, (U) mutant corn, (V) marigold petals, (W) gift from Perdue, Salisbury, MD, USA.

<sup>c</sup> VKI Water Quality Institute, Denmark.

<sup>d</sup> Fluka (Milwaukee, WI, USA).

<sup>e</sup> Trivial name.

<sup>f</sup> Sigma (St. Louis, MO, USA).

(EM Science), ammonium acetate (JT Baker) and 0.4 M tetrabutyl ammonium hydroxide titrant (JT Baker). Water was deionized and filtered. Solvent A

was 70:30 (v/v) methanol, 28 mM aqueous TBAA, pH 6.5. Solvent B was methanol or ethanol (Table 2).

Table 2

Chromatographic conditions used for generating pigment  $t_R$  databases for use with DryLab chromatography modeling software<sup>a</sup>

Column	Column dimensions (mm)	Column temperatures (°C)	Gradient times (min)	Initial %B	Flow rate (ml/min)
<b>C<sub>8</sub> columns</b>					
Hypersil mos-2	100×4.6	40, 60	15, 45	5	1.0
Luna C <sub>8</sub> (2)	100×4.6	40, 60	15, 45	5	0.8
Eclipse XDB	150×4.6	45, 60	20, 60	0	1.0
<b>C<sub>18</sub> columns</b>					
Supelcosil LC 318	250×4.6	45, 60	20, 60	5	1.0
Supelcosil LC PAH	100×4.6	45, 60	15, 45	5	1.0
Vydac 201TP	250×3.2	45, 60	20, 60	0	0.6
YMC ODS-AL	150×4.6	40, 60	20, 60	5	1.0
Zorbax Bonus-RP C <sub>14</sub>	250×4.6	45, 60	20, 60	0	1.2
YMC C <sub>30</sub>	250×4.6	40, 60	20, 60	20	1.0

<sup>a</sup> Pigments were analyzed on each column at two values of  $T$  and two values of  $t_G$ . All gradients were linear from the specified initial percent solvent B to 100% solvent B. Solvent A, 70:30 methanol, 28 mM TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol, except for the YMC C<sub>30</sub> column where it was ethanol. Flow-rates were adjusted to keep backpressure below 180 bar.

Table 1. Continued

Code	Pigment name	SCOR [26] WG 78 abbreviation	Source <sup>b</sup>	$t_R$ (min)	$R_s$ (peak code)	Visible absorbance spectra (nm)
37	Phytylated chlorophyll <i>c</i> -like	phytyl-chl <i>c</i>	J R	23.53		460, 588, 636
38	** Divinyl chlorophyll <i>a</i>	DV chl <i>a</i>	U	23.76		(390), 442, 622, 666
m	Unknown	–	L	23.91	NR m/39	458, 588, 638
39	** Monovinyl chlorophyll <i>a</i>	chl <i>a</i>	Fluka <sup>d</sup> A–T	23.96		(390), 432, 620, 666
40	Divinyl chlorophyll <i>a'</i>	DV chl <i>a'</i>	U	24.13		(386), 440, 622, 666
41	Monovinyl chlorophyll <i>a'</i>	chl <i>a'</i>	Fluka <sup>d</sup> A–T	24.33		(388), 432, 618, 666
n	Unknown	–	P	25.58		(422), 442, 470
42	* $\beta,\epsilon$ -Carotene ( $\alpha$ -carotene) <sup>e</sup>	$\beta,\epsilon$ -car	Sigma <sup>f</sup> G H J L O P S	26.65	NR 42/43	(422), 446, 474
43	* $\beta,\beta$ -Carotene ( $\beta$ -carotene) <sup>d</sup>	$\beta,\beta$ -car	Fluka <sup>d</sup> , A–G, I–N P–U	26.71		(430), 452, 476

<sup>a</sup> Pigments with \* or \*\* were used with all columns ( $t_R$  and  $R_s$  data given are specific to the method described in Section 3.6).  $R_s$  is  $\geq 1.5$  unless otherwise noted (NR =  $R_s < 1.0$ ). Visible absorbance spectra was obtained from the in-line HPLC photo-diode array detector (350–700 nm) (solvent A, 70:30 methanol, 28 mM TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol). Parentheses indicate spectral shoulder.

<sup>b</sup> Sources: Horn Point batch cultures, (A) *Prorocentrum minimum*, (B) *Gyrodinium uncatenum*, (C) *Gyrodinium galatheanum*, (D) *Thalassiosira pseudonana*, (E) *Isochrysis* sp. (TISO strain, CCMP 1324), (F) *Dunaliella tertiolecta* (CCMP 1320), (G) *Pycnococcus provasolii* (CCMP 1203), (H) *Pyrenomonas salina*, (I) *Synechococcus* sp.; CCMP individual cultures, (J) *Emiliania huxleyi* (CCMP 373), (K) *Synechococcus* cf. *elongatus* (CCMP 1629), (L) *Chrysochromulina polyepsis* (CCMP 1757), (M) *Amphidinium carterae* (CCMP 1314), (N) *Pelagococcus subviridis* (CCMP 1429), (O) *Guillardia theta* (CCMP 327), (P) *Micromonas pusilla* (CCMP 1545), (Q) *Nannochloropsis* sp. 1 (CCMP 531), (R) *Isochrysis galbana* (CCMP 1323); all other sources, (S) *Pelagomonas calceolata*, (T) *Aureococcus anophagefferens*, (U) mutant corn, (V) marigold petals, (W) gift from Perdue, Salisbury, MD, USA.

<sup>c</sup> VKI Water Quality Institute, Denmark.

<sup>d</sup> Fluka (Milwaukee, WI, USA).

<sup>e</sup> Trivial name.

<sup>f</sup> Sigma (St. Louis, MO, USA).

(EM Science), ammonium acetate (JT Baker) and 0.4 M tetrabutyl ammonium hydroxide titrant (JT Baker). Water was deionized and filtered. Solvent A

was 70:30 (v/v) methanol, 28 mM aqueous TBAA, pH 6.5. Solvent B was methanol or ethanol (Table 2).

Table 2

Chromatographic conditions used for generating pigment  $t_R$  databases for use with DryLab chromatography modeling software<sup>a</sup>

Column	Column dimensions (mm)	Column temperatures (°C)	Gradient times (min)	Initial %B	Flow rate (ml/min)
<b>C<sub>8</sub> columns</b>					
Hypersil mos-2	100×4.6	40, 60	15, 45	5	1.0
Luna C <sub>8</sub> (2)	100×4.6	40, 60	15, 45	5	0.8
Eclipse XDB	150×4.6	45, 60	20, 60	0	1.0
<b>C<sub>18</sub> columns</b>					
Supelcosil LC 318	250×4.6	45, 60	20, 60	5	1.0
Supelcosil LC PAH	100×4.6	45, 60	15, 45	5	1.0
Vydac 201TP	250×3.2	45, 60	20, 60	0	0.6
YMC ODS-AL	150×4.6	40, 60	20, 60	5	1.0
Zorbax Bonus-RP C <sub>14</sub>	250×4.6	45, 60	20, 60	0	1.2
YMC C <sub>30</sub>	250×4.6	40, 60	20, 60	20	1.0

<sup>a</sup> Pigments were analyzed on each column at two values of  $T$  and two values of  $t_G$ . All gradients were linear from the specified initial percent solvent B to 100% solvent B. Solvent A, 70:30 methanol, 28 mM TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol, except for the YMC C<sub>30</sub> column where it was ethanol. Flow-rates were adjusted to keep backpressure below 180 bar.

were clarified using 0.45- $\mu\text{m}$ , PTFE, HPLC syringe cartridge filters fitted with glass fiber prefilters (Scientific Resources Inc., Eatontown, NJ, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Criteria for conditions used for collecting input data

The conditions used for collecting input data on each column are detailed in Table 2. We selected values of  $T$  between 40 and 60°C because these above-ambient temperatures are easily attainable by most column thermostating devices and because our previous work [9,23,24] had indicated that these values of  $T$  provided resolution ( $R_s$ ) between a great number of pigments. We felt that differences in  $T$  not greater than 20°C would be more likely to ensure accurate predictions as Sander and Wise [30] had observed that separation selectivity ( $\alpha$ ) does not necessarily change in a linear fashion over a wide range of  $T$  (–20 to 100°C). Temperatures we used do not necessarily result in the best  $R_s$  between all pigments. In fact, others have seen [9,13,14,16] that lower  $T$  values often improved  $R_s$  between selected pigments.

We selected values for  $t_G$  of 15 and 45 min or 20 and 60 min (Table 2) depending on column retentiveness. Some pigments eluted after the gradient and an isocratic hold on solvent B was necessary in these cases.

We used the same mobile phase with all columns as this study did not extend to the effects of mobile phase on separations. Thus we used methanol as solvent B even when a solvent of stronger elutropic strength may have been more practical, except with the  $C_{30}$  column. Because it was extremely retentive, it was necessary to change to a stronger solvent (ethanol).

Historically, many pigment separation methods have used a gradient system where solvent A is based on that of Mantoura and Llewellyn [5]: (80:20) methanol:0.5  $M$  aqueous ammonium acetate and 0.025  $M$  TBAA, pH 7.1. Many pigment analysts have subsequently deleted TBAA from solvent A [3,4,7–14,16–20,31] as reviewed in Jeffrey et al. [1]. During initial data collection we observed abnormal

chl  $a$  retention (as with excessive chl  $a$  allomerization) when highly concentrated algal extracts and chl  $a$  standards were injected while ammonium acetate was used in solvent A without TBAA. This abnormal retention was eliminated by adding butylated hydroxy toluene (BHT) to the mobile phase (as suggested by an anonymous reviewer) or as we did, by replacing ammonium acetate with TBAA. We have avoided the costs ordinarily associated with the purchase of TBAA ion-pairing reagent by formulating it ourselves from the acidification of tetrabutyl ammonium hydroxide with acetic acid. TBAA was also advantageous in positioning the early eluting chlorophylls in front of the early eluting xanthophylls on the  $C_{30}$  column. In contrast, when ammonium acetate was used in solvent A, the early eluting chlorophylls were retained longer, eluted among the early eluting xanthophylls and caused many pigments to co-elute.

#### 3.2. Column characteristics

Physical characteristics of the columns used were diverse (Table 3). Small particle sizes and long column dimensions generally increase column efficiency,  $N$ , while other stationary phase characteristics have a greater effect on  $\alpha$ . Of the nine stationary phases used, two were listed by the vendors as polymeric and five as monomeric. The remaining two, the Supelcosil LC PAH and the LC 318, for which the bonding chemistry was listed as proprietary, were characterized as polymeric and monomeric, respectively, by Epler et al. [32].

Plate number ( $N$ ) calculations for gradient data are complex but are conveniently calculated by the simulation software. Hence we easily compared  $N$  among columns. With DryLab one can enter the value of  $N$  observed during data collection or, as we did, enter various values of  $N$  until the accurate value is found (at which point the software predictions of peak width and  $R_s$  match those observed during data collection). Specifically, we used the peak widths and  $R_s$  of pairs eluting midway in the gradient from input data derived from the cooler  $T$  and longer  $t_G$  (Table 2) to identify the accurate value of  $N$  for each column. Next, we used the software to determine  $N$  for each column after normalizing the variables which affect  $N$ . Specifically, we entered the same

column dimension (250×4.6 mm), particle size (5 μm) and flow-rate ( $F=1$  ml/min), as these varied among columns in the experimental procedures. In all cases, the monomeric columns were more efficient (with higher  $N$  values) than the polymeric  $C_{18}$  columns (Table 4). The columns with the highest efficiencies were the Luna  $C_8$  and the Eclipse XDB  $C_8$ . We show no data for the  $C_{30}$  column as we had used a different mobile phase and thus the observed  $N$  (8500) cannot be compared exactly with values of  $N$  for the other columns.

We used the simulation software to compare the resolving power of each column free from the effects of their differences in  $N$  and column dimensions. Inspection of the  $R_s$  equation for gradient elution,  $R_s = 1/4N^{1/2}(\alpha - 1)[k^*/(1 + k^*)]$  [33], reveals the interaction among  $N$ ,  $\alpha$  and  $k^*$ . In the computer simulation software, we normalized  $N$  and factors affecting  $k^*$  among columns. With these variables normalized, changes in  $R_s$  attained from manipulations to  $T$  or  $t_G$  reflect their effects on separation selectivity ( $\alpha$ ). The quantity  $k^*$  is defined by  $(t_G F)/ (V_m \Delta\phi S)$ , where  $t_G$  is gradient time in min,  $\Delta\phi$  the percent change in solvent B during the gradient divided by 100,  $F$  the flow-rate (ml/min),  $V_m$  the column volume (ml) and  $S$  is a constant that is a function of the molecular structure of each compound. We adjusted variables affecting  $k^*$  so that it was equal for each column by using a gradient range of 20–100% solvent B,  $F$  of 1 ml/min and column dimensions of 250×4.6 mm. Values of  $S$  can be assumed to be approximately equal for a given solute

on different columns [34]. After normalizing  $k^*$ , we entered the same  $N$  value (10 000) for each column. Next we set  $t_G$  to 20 min ( $T=50^\circ\text{C}$ ) and used the simulation software to predict the  $R_s$  between adjacent pigments. The  $R_s$  predicted from the 20 min  $t_G$  was compared to the  $R_s$  predicted between the same pigment pairs when  $t_G$  was 60 min ( $T=50^\circ\text{C}$ ). We then used the simulation software to predict the  $R_s$  between adjacent pigments at  $45^\circ\text{C}$  ( $t_G=45$  min) and calculated the change in  $R_s$  seen between the same pairs when  $T$  was set to  $60^\circ\text{C}$  ( $t_G=45$  min.). We used the same pigments with each column and included only those that eluted during the gradient with all sets of conditions used. As a result, chlorophylls were excluded.

The effects of variations to  $t_G$  and  $T$  on the resolving power of each column are shown in Fig. 1. We illustrate the results with columns sorted first by bonding chemistry (either monomeric or polymeric) and second by aliphatic chain length ( $C_8$  to  $C_{30}$ ) (Fig. 1,  $x$  axis). (Note that data from the  $C_{30}$  column is not relevant to the other columns as previously stated.) The change in  $R_s$  associated with the 3-fold change in  $t_G$  (●) and the  $15^\circ$  difference in  $T$  (○) are shown ( $y$  axis). There was tremendous variability (as indicated by the distribution of data along the  $y$  axis) for both  $t_G$  and  $T$  for all columns. Changes in  $R_s$  resulting from  $T$  (○) were generally greater on the polymeric columns relative to the monomeric columns. In fact, the average median value of changes in  $R_s$  associated with  $T$  on the two  $C_{18}$  polymeric columns ( $1.17 \pm 0.12$ ) was 3.7 times the average

Table 4

Observed values of  $N$  (derived from input data and experimental conditions given) and normalized values of  $N^a$ 

Column	Experimental conditions			$N$	
	Column dimensions (mm)	Particle size (μm)	Flow rate (ml/min)	Observed	Normalized
Eclipse XDB $C_8$	150×4.6	3.5	1.0	17 000	22 000
Luna $C_8$ (2)	100×4.6	3	0.8	10 500	21 850
Hypersil mos-2 $C_8$	100×4.6	3	1.0	8000	12 550
Bonus-RP $C_{14}$	250×4.6	5	1.2	10 500	10 250
LC318 $C_{18}$	250×4.6	5	1.0	15 000	15 000
ODS AL $C_{18}$	150×4.6	5	1.0	8800	14 800
20ITP $C_{18}$	250×3.2	5	0.6	5250	4370
LC PAH $C_{18}$	100×4.6	3	1.0	2200	4400

<sup>a</sup> When normalizing  $N$ : column dimensions, 250×4.6 mm; particle size, 5 μm; and flow-rate, 1 ml/min.



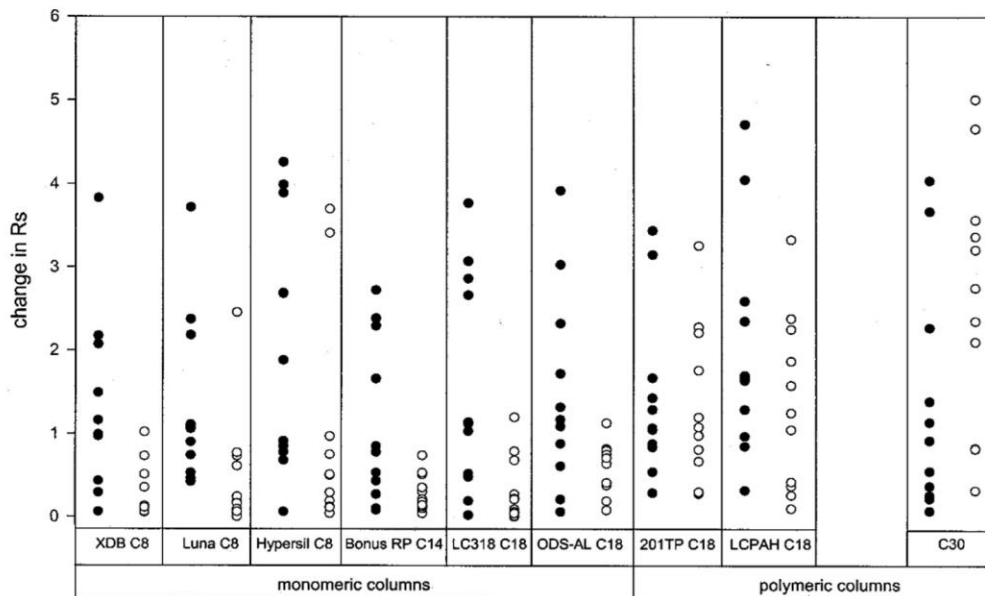


Fig. 1. Changes in  $R_s$  as a function of  $t_G$  or  $T$ . All data derived from computer simulations using the input data from each column. The theoretical change in  $R_s$  (y axis) resulting from two values of  $t_G$  (●), 20 and 60 min (where  $T=50^\circ\text{C}$ ) and the change in  $R_s$  resulting from two values of  $T$  (○), 45 and  $60^\circ\text{C}$  (where  $t_G=45$  min) is shown for each column. Columns were normalized for factors that affect  $R_s$  ( $N$  and  $k^*$ ; details in Section 3.2) prior to calculating  $R_s$ . Mobile phase: solvent A, 70:30 (v:v) methanol, 28 mM aqueous TBAA, pH 6.5; solvent B methanol for all but the  $C_{30}$  column (ethanol). Data from this column are therefore not directly comparable to the others.

median value associated with  $T$  on the monomeric columns ( $0.32 \pm 0.23$ ). Others have also demonstrated that phytoplankton pigment separations on polymeric columns are highly sensitive to changes in  $T$  [9,13–16]. The average median value of changes in  $R_s$  associated with  $t_G$  for the two  $C_{18}$  polymeric columns ( $1.37 \pm 0.42$ ) and the six monomeric columns ( $1.17 \pm 0.38$ ) were more similar relative to the differences seen with  $T$ . While data for the  $C_{30}$  column is not directly comparable to others, it was sensitive to both changes of  $T$  and  $t_G$  with somewhat greater sensitivity to  $T$ .

These data (Fig. 1) explore separation characteristics among columns independent of differences in  $N$ . However, factors affecting separations are only useful if peak widths are sufficiently narrow so that adequate  $R_s$  (ideally  $\leq 1.5$ ) is attained. Highly efficient columns are therefore advantageous. In fact, the relatively large changes in  $R_s$  shown for the LC PAH  $C_{18}$  column (Fig. 1, where  $N$  was normalized to 10 000) were in reality unattainable as peak widths were abnormally broad during experimental con-

ditions (observed  $N=2200$ ). The low efficiency seen with this column may have resulted from an incompatibility with the conditions used. We show no subsequent data for this column.

While the independent effects of  $T$  and  $t_G$  are of interest, their combined effects are more important. The resolution map of the DryLab simulation software is most useful with its visual display of the  $R_s$  attainable at all possible combinations of  $t_G$  and  $T$ , as Dolan et al. [24] illustrated with 14 different samples (including algal pigments).

### 3.3. Using computer simulations to develop methods for pigment isolation

Our strategy for isolating pigment standards was to isolate as many as possible from the same source using methods which were fast and resulted in a final product of high chromatographic and peak purity. Here we demonstrate how we used computer simulations to develop methods for isolating pigments from

extracts of *G. galatheanum* and *T. pseudonana* combined.

For a column to be selected for pigment isolation, we required that it: (1) exhibit high sample capacity, (2) low back pressure, (3) high efficiency, (4) not excessively retain the latest eluting pigment in the extract ( $\beta,\beta$ -car) and (5) provide exaggerated  $R_s$  ( $>3.0$ ) between pigments to be isolated. The LC 318  $C_{18}$  stationary phase met our requirements and computer simulations indicated that the desired  $R_s$  could be achieved between a number of the 10 pigments to be isolated from this algal mixture. The simulation software also indicated that a shorter

column (100 mm) would fulfil our requirements and shorten run times.

In Fig. 2A, we show the chromatogram produced on the LC 318  $C_{18}$  column (100 $\times$ 4.6 mm) from the injection of the combined extract of *G. galatheanum* and *T. pseudonana*. The chl *c*3 (1), hex-fuco (15), diato (23), and the gyroxanthin diester-like (28 and 29) pigment fractions were collected free of contamination from this injection. Three impure fractions, chl *c*1, chl *c*2 and chl *d* (5, 3, 6), but-fuco and fuco (9, 10) and diadino plus an unknown degradant (19+?) were collected and subsequently purified using other methods.

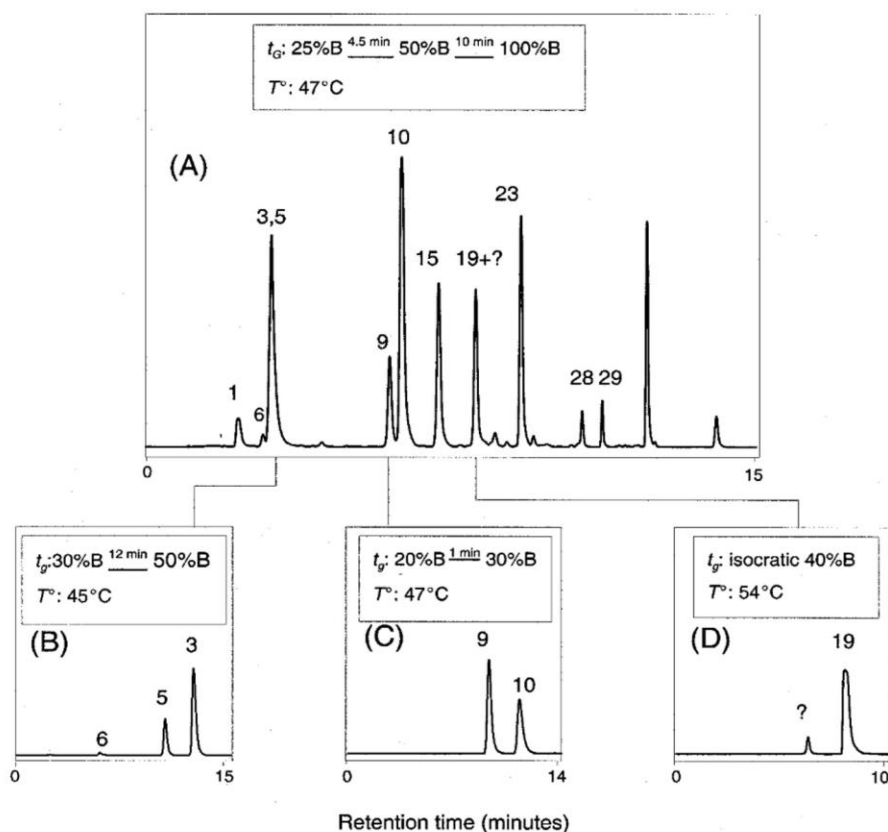


Fig. 2. Chromatograms from methods developed with the simulation software for the isolation of pigment standards from *T. pseudonana* and *G. galatheanum*. Peaks 1, 15, 23, 28 and 29 (identities in Table 1) were collected as pure fractions from the initial injection (A). Impure fractions were collected and subsequently purified on other methods (B–D). Mobile phase: solvent A, 70:30 (v:v) methanol, 28 mM aqueous TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol. For the segmented gradient in (A) 50%B is reached at 4.5 min and 100%B at 10 min. Flow was individually adjusted to shorten run time. Columns used (details in Table 3): (A) LC 318  $C_{18}$ , 100 $\times$ 4.6 mm; (B)  $C_{30}$ ; (C,D) 201TP  $C_{18}$ . Inject volume 900  $\mu$ l (sample premixed with buffer before injection).



For final purification of the three impure fractions, we developed methods using polymeric columns capable of achieving exaggerated  $R_s$  in short analysis times (Fig. 2B–D). The chl *c*1 (5) and chl *c*2 (3) fractions were each collected free of contamination from chl *a* (6) with a method using the  $C_{30}$  column (Fig. 2B). We used the 201TP  $C_{18}$  column for isolating but-fuco (9) from fuco (10) (Fig. 2C) and diadino (19) free of contamination by the unknown pigment (Fig. 2D). After isolation, we transferred the pigments from the mobile phase in which they had been collected to the solvent required for use with the corresponding extinction coefficient. Chl *c*1 and *c*2 were transferred to acetone using solid-phase extraction [35]. The other pigments were transferred to ethanol by individually injecting each onto the  $C_{30}$  column with ethanol as the isocratic mobile phase and then collecting the pigment as it eluted from the column. We varied values of  $T$  to optimize the retention of each pigment such that the peak to be isolated was sufficiently removed from the injection peak and the run time was not excessively long.

Finally, the isolated standards were checked for chromatographic purity on each of two analytical methods using different columns (methods not shown). Chromatographic purity was >95% in all cases. Peak purity was also demonstrated by comparing the absorbance spectra on the peak upslope, apex and downslope attained from the HPLC in-line photo-diode array detector.

### 3.4. Optimizing pigment separations through changes to column temperature and gradient time

We used computer simulations to identify chromatographic conditions capable of resolving the greatest number of very important pigments in our test mixture. Some pigments in this mixture provide more meaningful information than others with regard to algal class diversity and abundance so we ranked them by their degree of importance as we anticipated that not all could be resolved in one analysis. Fourteen pigments classified as very important to resolve (those marked with \*\*, Table 1) and 13 pigments considered less important to resolve (those marked with \*, Table 1) were included in the test mixture. Pigments with no such notation (Table 1)

and in our test mixture (peak codes 8, 32–34, 40 and 41, Table 1) were considered as interference peaks only. We sought fast methods, rejected analysis times greater than 60 min as impractical even if the longer analysis times improved separations and avoided segmented gradients in favor of simple linear gradients. We emphasize that the values of  $T$  and  $t_G$  available for use were constrained by the conditions used while collecting input data and are not necessarily optimal for all pigment pairs.

Analyses were conducted on each of eight columns using the chromatographic conditions identified in DryLab. The resulting chromatograms and conditions used are illustrated (Figs. 3–6). No column was able to resolve all pigments ( $R_s \geq 1.0$ ) in the same analysis. The co-eluting pigments seen with each method are summarized (Table 5).

Only the  $C_{30}$  column was capable of separating all pigments (with \*\* or \*, Table 1) in our test mixture, albeit not in one run (Fig. 3A,B). With simple manipulations to  $t_G$  and  $T$ , this column resolved all chlorophylls (Fig. 3A) and all carotenoids and xanthophylls (Fig. 3B). We used a segmented gradient in Fig. 3B simply to shorten run time. The other polymeric column, the 201TP  $C_{18}$ , achieved separation between the maximum number of carotenoids at 60°C. Others have shown that at sub-ambient [9,14,16] and ambient [13] temperatures, this column can resolve the chlorophyll pigments not resolved here.

The co-elution of some pigment pairs was related to the aliphatic chain length of the stationary phase. For example, the separation of monovinyl chl species (chl *c*1 and chl *a*) from their divinyl counterparts (chl *c*2 and DV chl *a*) was achieved easily on the  $C_{30}$  and  $C_8$  columns but not on others (DV chl *b* and chl *b* were resolved only on the  $C_{30}$  column).  $\beta$ , $\epsilon$ -car and  $\beta$ , $\beta$ -car were resolved on all but the  $C_8$  columns. The co-elution of these carotene pigments is of little importance in describing algal class diversity in natural samples; however, the identification of DV chl *a* in a natural sample uniquely indicates the presence of prochlorophytes and therefore this separation is very important in the analysis of oceanic samples.

The co-elution of other pigments did not seem to correlate with stationary phase aliphatic chain length. The Hypersil  $C_8$  and the LC 318  $C_{18}$  (Fig. 4A,B) did

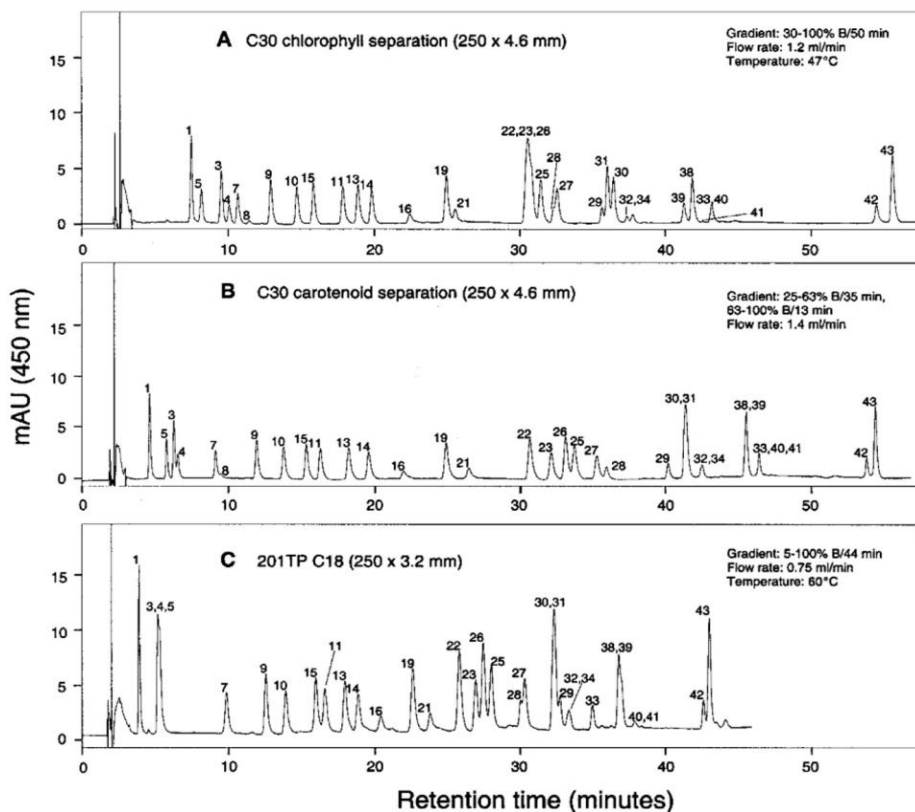


Fig. 3. Separations of pigments in a test mixture from methods developed with the simulation software for use with two polymeric columns. Separations were developed for the  $C_{30}$  column to separate all chlorophylls (Fig. 3A) and to separate all carotenoids and xanthophylls (Fig. 3B). The separation shown in Fig. 3C was developed for the 201TP  $C_{18}$  column to separate the maximum number of very important pigments in the shortest analysis time. Experimental conditions: mobile phase-solvent A, 70:30 (v:v) methanol, 28 mM aqueous TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol (except (A,B) when it was ethanol); column details in Table 3; peak identities in Table 1.

not resolve neo, pras, and viola (11, 13, 14). Resolution between lut and zeax (26, 25) was the most limiting ( $R_s=0.6$ ) with the Bonus-RP  $C_{14}$  and the ODS-AL  $C_{18}$  (Fig. 5A,B); somewhat limiting ( $R_s 1.0 \geq 1.2$ ) on the other  $C_{18}$  columns (Figs. 3C and 4B) and the  $C_{30}$  column (Fig. 3B); and the best ( $R_s \geq 1.5$ ) with the  $C_8$  columns (Figs. 4A, 6A and 6B). Resolution between lut and zeax was easily improved on the two polymeric columns (the  $C_{30}$  and the 201TP  $C_{18}$ ) with changes to  $T$  at the expense of decreases in  $R_s$  between other pigments. With the ODS-AL  $C_{18}$ , trends seen on the resolution map (not shown) for this column hinted that temperatures  $<40^\circ\text{C}$  (not available for use with simulations) may have been advantageous for resolving lut from zeax.

Thus, it is unfortunate that we had not evaluated this column at near-ambient temperatures. The Luna  $C_8$  and the Eclipse XDB  $C_8$  columns provided separations of the maximum number of very important pigments in one analysis (Fig. 6A,B and Table 5).

### 3.5. Accuracy of computer simulations

We found, as have others [33,36], the computer simulations to be highly accurate when comparing observed data with predicted data. Ghrist et al. [37] found that prediction accuracy was best when input data and modeled data were collected close together in time. We observed an average deviation between predicted and observed  $t_R$  values of 0.06 and 0.18

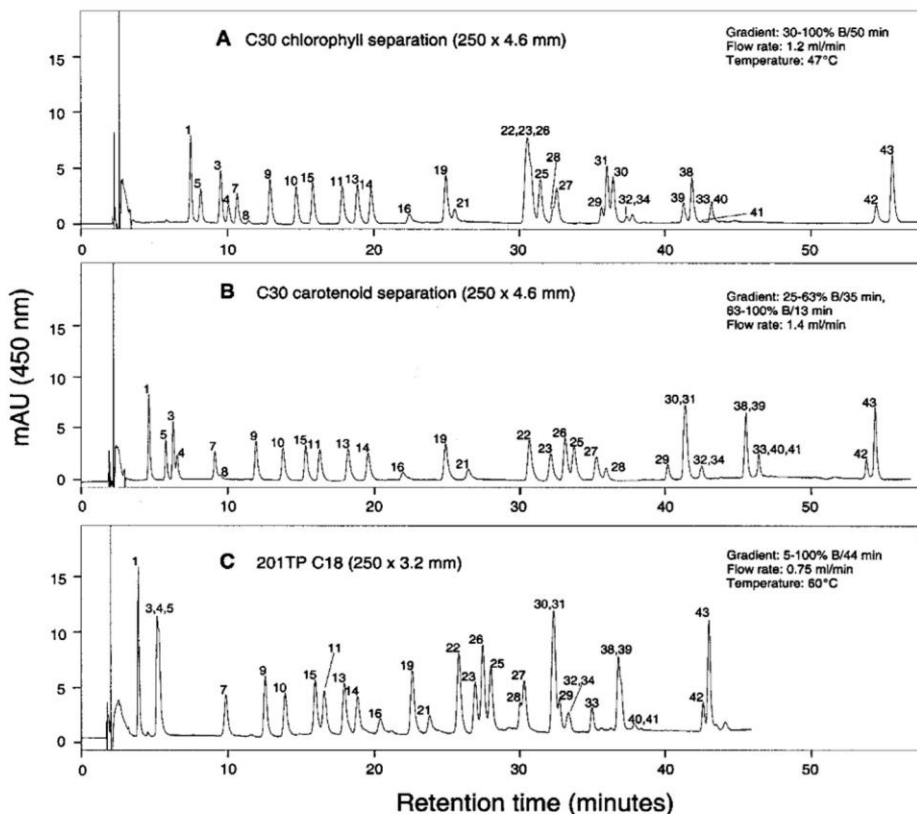


Fig. 3. Separations of pigments in a test mixture from methods developed with the simulation software for use with two polymeric columns. Separations were developed for the  $C_{30}$  column to separate all chlorophylls (Fig. 3A) and to separate all carotenoids and xanthophylls (Fig. 3B). The separation shown in Fig. 3C was developed for the 201TP  $C_{18}$  column to separate the maximum number of very important pigments in the shortest analysis time. Experimental conditions: mobile phase-solvent A, 70:30 (v:v) methanol, 28 mM aqueous TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol (except (A,B) when it was ethanol); column details in Table 3; peak identities in Table 1.

not resolve neo, pras, and viola (11, 13, 14). Resolution between lut and zea (26, 25) was the most limiting ( $R_s=0.6$ ) with the Bonus-RP  $C_{14}$  and the ODS-AL  $C_{18}$  (Fig. 5A,B); somewhat limiting ( $R_s 1.0 \geq 1.2$ ) on the other  $C_{18}$  columns (Figs. 3C and 4B) and the  $C_{30}$  column (Fig. 3B); and the best ( $R_s \geq 1.5$ ) with the  $C_8$  columns (Figs. 4A, 6A and 6B). Resolution between lut and zea was easily improved on the two polymeric columns (the  $C_{30}$  and the 201TP  $C_{18}$ ) with changes to  $T$  at the expense of decreases in  $R_s$  between other pigments. With the ODS-AL  $C_{18}$ , trends seen on the resolution map (not shown) for this column hinted that temperatures  $<40^\circ\text{C}$  (not available for use with simulations) may have been advantageous for resolving lut from zea.

Thus, it is unfortunate that we had not evaluated this column at near-ambient temperatures. The Luna  $C_8$  and the Eclipse XDB  $C_8$  columns provided separations of the maximum number of very important pigments in one analysis (Fig. 6A,B and Table 5).

### 3.5. Accuracy of computer simulations

We found, as have others [33,36], the computer simulations to be highly accurate when comparing observed data with predicted data. Ghrist et al. [37] found that prediction accuracy was best when input data and modeled data were collected close together in time. We observed an average deviation between predicted and observed  $t_R$  values of 0.06 and 0.18

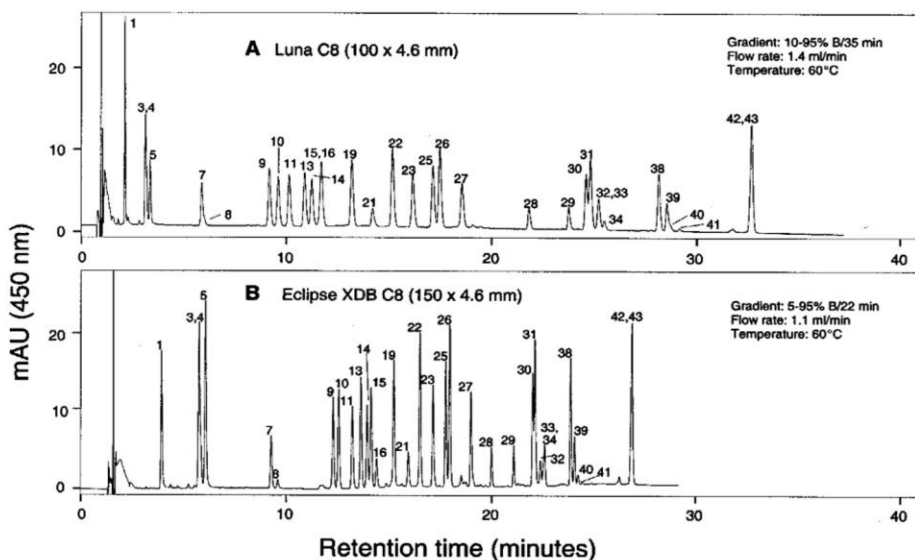


Fig. 6. Separation of pigments in the test mixture on two columns that, relative to the columns in Fig. 3, 4 and 5 separated the most pigments in one run. Methods were developed for the (A) Luna C<sub>8</sub> and (B) the Eclipse XDB C<sub>8</sub> columns for the purpose of separating the maximum number of very important pigments in the shortest analysis time (experimental details in Fig. 3 legend).

min (using all pigments but chl *c*3) when input data and experimental data were collected either within 2 days or up to 21 days, respectively. When all early

eluting chlorophylls were excluded from the average, the deviation dropped by 50% in both cases. Injector programming and large injection volumes (especially

Table 5

Pigments in the column test mixture that co-eluted, as shown in Figs. 3–6 (columns and conditions therein described)<sup>a</sup>

Co-eluting pigments (pigment codes)	Columns featured in Figs. 3 through 6								
	Fig. 3A C <sub>30</sub>	Fig. 3B C <sub>30</sub>	Fig. 3C 201TP C <sub>18</sub>	Fig. 4A Hypersil C <sub>8</sub>	Fig. 4B LC318 C <sub>18</sub>	Fig. 5A Bonus-RP C <sub>14</sub>	Fig. 5B ODS-AL C <sub>18</sub>	Fig. 6A Luna C <sub>8</sub>	Fig. 6B XDB C <sub>8</sub>
Chl <i>c</i> 2, Mg DVP, chl <i>c</i> 1 (3, 4, 5)			x		x	x	x		
Chl <i>c</i> 2, Mg DVP (3, 4)			x	x	x	x	x	x	x
Neo, pras, viola (11, 13, 14)				x	x				
Hex-fuco, asta (15, 16)								x	
Asta, diadino (16, 19)					x				
Allo, diato, lut (22, 23, 26)	x								
Zea, Lut (25, 26)						x	x		
Cantha, gyroxanthin-like (27, 28)	x		x						
Gyroxanthin-like, chl <i>b</i> (29, 31)	x								
Gyroxanthin-like, DV chl <i>b</i> , chl <i>b</i> (29, 30, 31)			x	x					
Chl <i>b</i> , DV chl <i>b</i> (30, 31)		x	x	x	x	x	x	x	x
DV chl <i>a</i> , chl <i>a</i> (38, 39)		x	x		x	x	x		
β,ε-car, β,β-car (42, 43)				x				x	x
No. of very important pigments resolved	10	11	10	10	8	9	9	12	13

<sup>a</sup> Co-elution of interference peaks (8, 32–34, 40 and 41) are not indicated here as they were resolved from important pigments (except for occasional co-elution of DV chl *a*' with chl *a*). Pigments are considered unresolved when  $R_s < 1.0$ . Pigment codes and their relative importance are shown in Table 1.

when injection solvent is different from the initial mobile phase) create a micro-environment at the head of the column, which has the potential to alter  $t_R$  values and peak widths of early eluting compounds, independent of effects resulting from the mobile phase gradient and  $T$ . In fact, the simulation software often flagged early eluting chlorophylls as exhibiting abnormal chromatographic behavior.

### 3.6. A new method for the analysis of phytoplankton pigments in natural samples

We selected the method developed for the Eclipse XDB  $C_8$  column for further testing for suitability in the routine quantitative analysis of phytoplankton pigments in natural samples. We chose this method because it provided the fastest analysis time, highest efficiency, maximum number of pigments resolved in one analysis and low solvent use relative to other methods tested. We identified the elution position of additional pigments, evaluated features important to quantitative analysis and demonstrated transferability.

As one is never certain what pigments may be present in natural samples, we analyzed extracts of additional algal monocultures (Fig. 7) containing pigments not in our test mixture to increase the library of pigments whose  $t_R$  values were documented by this method. We note several pigments that we could not identify (peak 18 and those listed with letters above the peaks, Fig. 7 and Table 1) but had the potential for co-elution with important pigments. For example, a pigment (18) with myxolike spectra (Fig. 7E) co-eluted with diadino. Furthermore, extracts of *C. polylepsis*, *E. huxleyi* and *I. galbana* were analyzed on the XDB  $C_8$  column and then again on the  $C_{30}$  column to examine the elution position of certain pigments. Data from the  $C_{30}$  column (not shown) enabled us to see that in *I. galbana* there were two additional pigments unknown to us (k and L in Fig. 7L and Table 1) imbedded in phytyl-chl *c* (37). Also, in *C. polylepsis* there were two pigments of identical spectra (m in Fig. 7I and Table 1) eluting as a shoulder on the front of chl *a* (39). Phytyl-chl *c* (37) from *E. huxleyi* (Fig. 7K) and *I. galbana* (Fig. 7L) each contained two identical fractions when analyzed on the  $C_{30}$  column.

Some additional pigments which we could identify co-eluted with others already identified. These include 4k-hex-fuco (12) shown in Fig. 7K (separated in [20]) that co-eluted with neo; phytyl-chl *c* (37) shown in Fig. 7K,L that co-eluted with chl *a* allom 2 (36) shown in Fig. 9A; and chl *a* (6) shown in Fig. 7A, F and H that co-eluted with chl *c*1. As the quantitation of chl *a* is important when reporting equivalent total chl *a* values, we suggest quantitation of chl *a* (in the presence of chl *c*1) by using a dichromatic equation as in Latasa et al. [38] based on simultaneous monitoring of two different wavelengths (665 and 450 nm). (Note: we have subsequently determined that chl *a* and chl *c*1 can be separated by increasing the molarity of TBAA.)

We evaluated factors important to quantitative analysis including such things as peak area and  $t_R$  reproducibility and minimum detection limits (MDL) [29]. We used data from seven replicate injections of a mixed standard containing 17 pigments ranging in concentration from 1.5 to 5.6 ng/injection ( $S/N$  varied from 20 to 70) for this evaluation. Peak area and  $t_R$  reproducibility averaged 0.75 %RSD and 0.04 %RSD, respectively. The average MDL of all 17 pigments evaluated was  $0.06 \pm 0.03$  ng per injection. Additionally we tested 14 chl *a* calibration curves on six different XDB  $C_8$  columns and found the mean slope to be  $3.436 \pm 0.046$  (1.325 %RSD). Linear dynamic range was observed from 0.5 to >700 ng of pigment per injection (where 0.5 ng chl *a* =  $S/N$  of 10 at  $665 \pm 10$  nm). We demonstrate the suitability of this method for the analysis of dilute oceanic samples where total chl *a* abundance (DV chl *a* plus chl *a*) was  $0.08 \mu\text{g/l}$  of seawater (Fig. 8).

We successfully transferred this method to a different HPLC (Beckman Gold) and laboratory (data courtesy of Ivy Collins and Alan Lewitus, University of South Carolina, Charleston, SC). We also tested the transfer to an HPLC with a high dwell volume by imposing an isocratic hold on initial conditions on our existing HPLC such that it mimicked an HPLC with a 10 ml dwell volume. This simulation also yielded results which were comparable to the original HPLC (Fig. 9).

Initial attempts to transfer this method to the Beckman Gold HPLC were unsatisfactory, as  $R_s$  between several peaks was poor. The column heater used with the Beckman Gold HPLC was a stand-

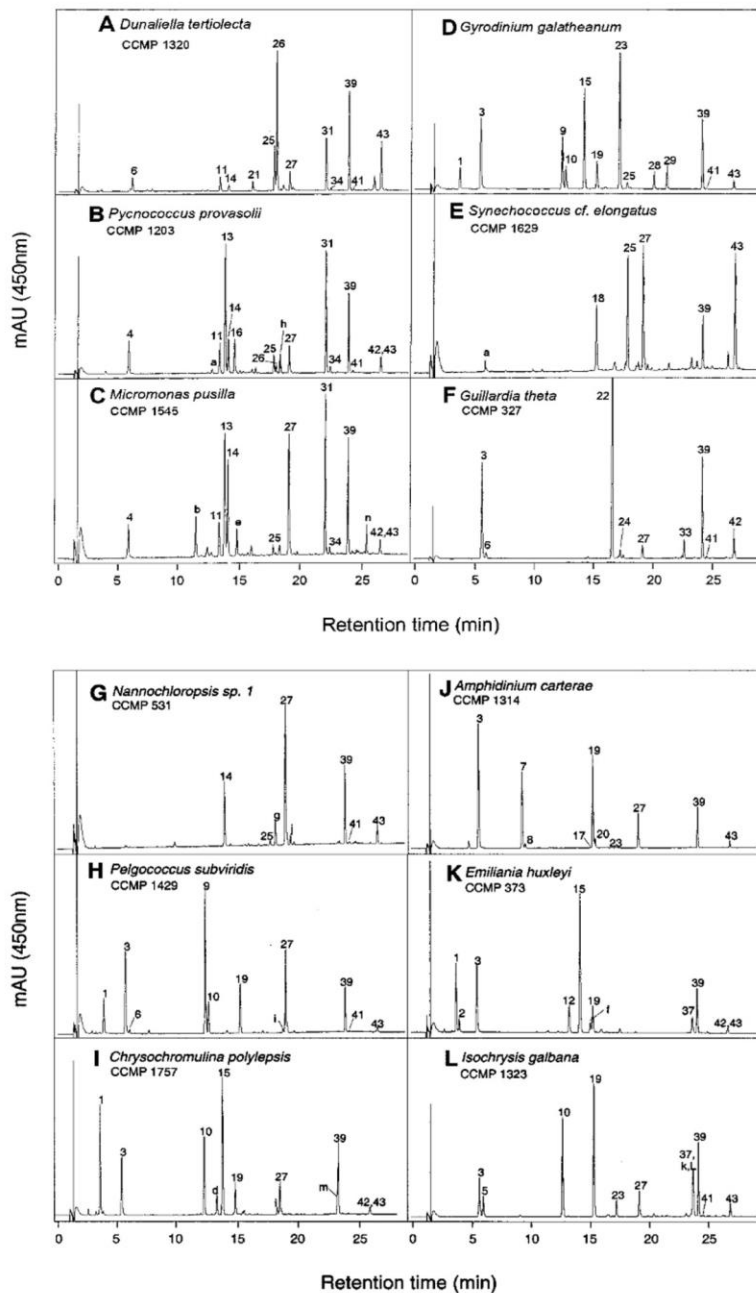


Fig. 7. Chromatograms of algal monocultures from various algal classes analyzed on the Eclipse XDB  $C_s$  column showing the elution position of additional pigments not previously shown with the same method (Fig. 6B). Column details in Table 3; peak identities in Table 1. All cultures except *Gyrodinium galatheanum* (D), which was grown at Horn Point Laboratory, were from the Provasoli-Guillard Culture Collection (CCMP). Canthaxanthin (27) was added as an internal standard to all cultures except those depicted in Fig. 7D and K. Data courtesy of Ajit Subramaniam (Department of Meteorology, UMD, College Park, MD, USA) and Robert Vaillancourt and Robert Guillard (Bigelow Laboratory for Ocean Science, West Boothbay Harbor, ME, USA).

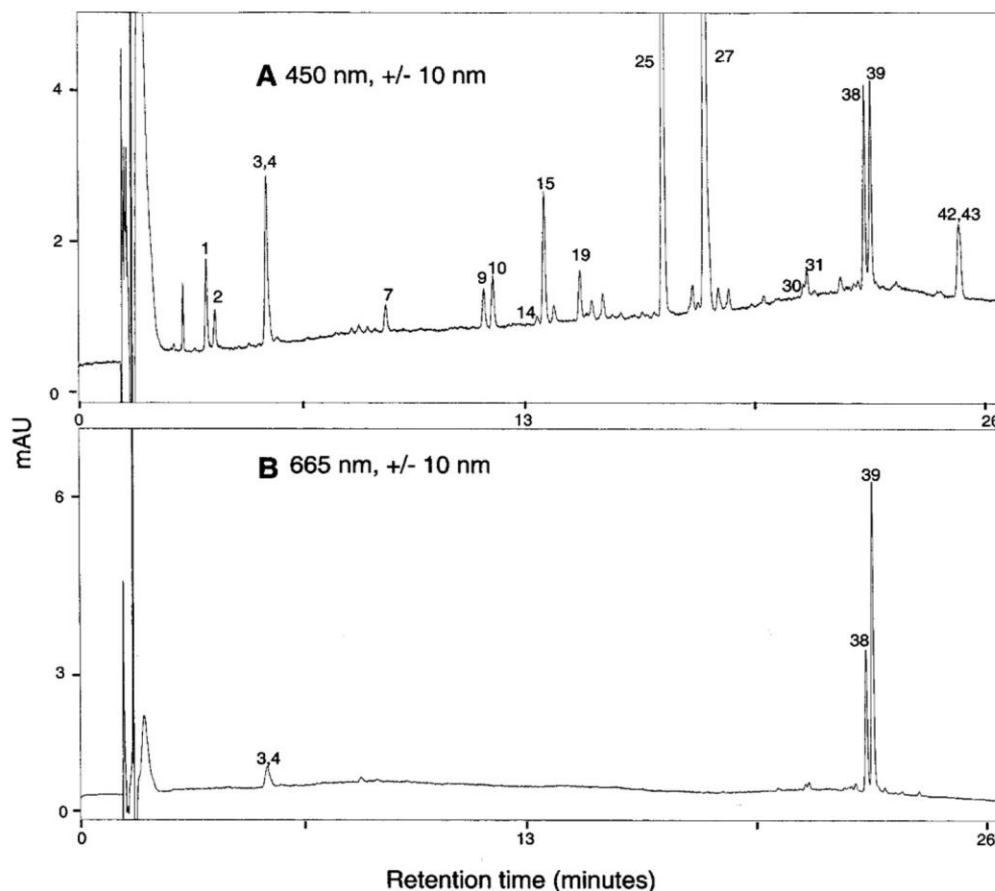


Fig. 8. Dilute natural sample analyzed on the Eclipse XDB  $C_{18}$  column. DV chl *a* (38) is approximately 2 ng per injection and chl *a* (39) 6 ng per injection. Column details in Table 3; pigment identities in Table 1. The sample was collected at 37°29.41'N, 73°23.00'W, which is 250 km ENE of the mouth of Chesapeake Bay (data courtesy of Lawrence Harding, Jr., Horn Point Laboratory, UMCES, Cambridge, MD, USA). Analyses using this method are also shown in Figs. 6B and 7.

alone unit which suspended the column in air inside. The solvent inlet line was not preheated and  $T$  was monitored by a glass mercury thermometer inserted into the column heater box.

Wolcott et al. [39] noted several reasons for the ineffective transfer of methods between instruments when elevated column temperatures ( $>40^{\circ}\text{C}$ ) are used. Of these reasons, the most likely to have adversely affected our ability to initially transfer this method to the Beckman HPLC were column thermostat inaccuracy and lack of mobile phase preheating prior to the column inlet (the latter of which causes temperature gradients within the column and a column  $T$  lower than expected). Column per-

formance equivalent to that seen with our HP HPLC was achieved by increasing the column heater set-point from 60 to 61.5°C and by inserting a piece of stainless steel tubing (100 cm long  $\times$  0.007" I.D.) between the injector and the column with approximately 82 cm coiled within the column heating box so that the mobile phase was pre-heated to the column  $T$ .

#### 4. Conclusions

The present study shows that method development software (DryLab) can be used to identify methods



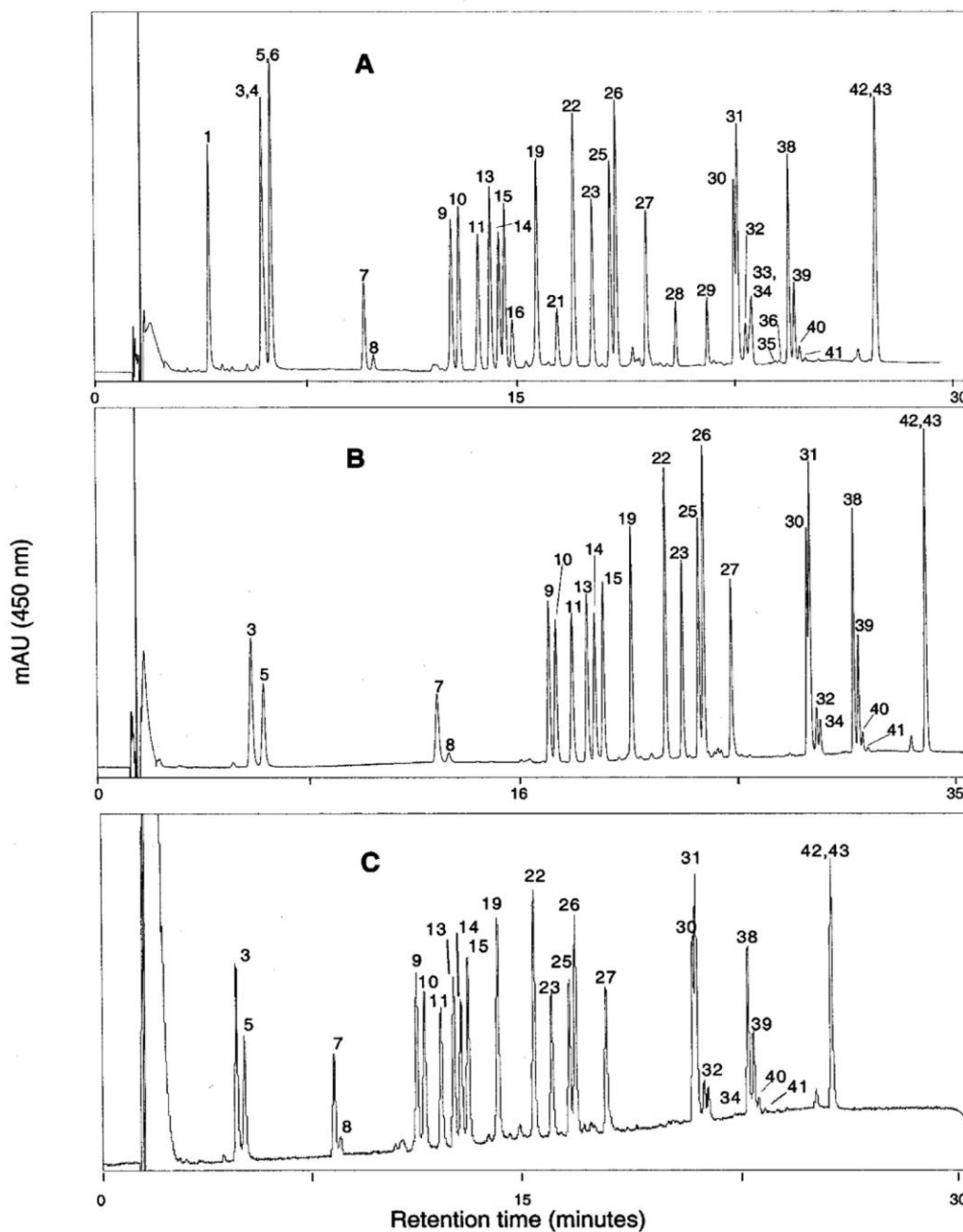


Fig. 9. Chromatograms showing transferability of the method developed for the Eclipse XDB  $C_8$  column. Column details in Table 3; peak identities in Table 1. Some pigments were present in (A) but not in (B,C). (A) HP 1100 HPLC, dwell vol = 3 ml; (B) HP 1100 HPLC, dwell vol = 10 ml (simulated); (C) Beckman Gold HPLC, dwell vol = 2.2 ml. Mobile phase: solvent A, 70:30 (v:v) methanol, 28 mM aqueous TBAA, pH 6.5; solvent B, methanol.  $F = 1.1$  ml/min.  $T$  (A,B) = 60°C;  $T$  (C) = 61.5°C. Gradient conditions in (A,C): linear gradient of 5–95% B in 22 min followed by an isocratic hold for 7 min and return to initial conditions in 2 min; in (B), initial conditions (5% solvent B) were held isocratically for 6.4 min to simulate a 10 ml dwell volume before starting the gradient. Methods in (A,B) used an injector program; in (C) the sample was premixed with buffer (50:50) and manually injected (200  $\mu$ l).



useful for the isolation and analysis of phytoplankton pigments on columns varying greatly in stationary phase physical characteristics and that changes to column  $T$  and  $t_G$  alone effectively enhance separations. It is unlikely, however, that the separations we identified are the best attainable for each column as we did not explore the use of other mobile phases and, as we limited our choice of  $T$  to what is conveniently attained with most column heating devices, we did not evaluate the effects of ambient or sub-ambient  $T$  on these columns.

Changes in  $R_s$  seen with adjustments to  $T$  were profound on the polymeric columns (relative to the monomeric columns) where changes of  $T$  as little as 5°C caused otherwise well-resolved peaks to co-elute. The modeling software was especially useful with the polymeric columns, as many pigments pairs were greatly affected by changes in  $T$  and optimal conditions were confined to a fairly narrow range of  $T$  and  $t_G$  in many cases. This sensitivity to  $T$  is advantageous when collecting pigments to be isolated as standards (where exaggerated  $R_s$  is required between selected pigments), or when attempting to gain information about peaks that are unresolved on the primary method used (as we did with pigments found in the extracts of *I. galbana*, *E. huxleyi* and *C. polyopsis* analyzed first on our primary method with the XDB  $C_8$  column and secondly on the  $C_{30}$  column). Extreme sensitivity to  $T$  can be disadvantageous, however, when attempting to reproduce methods between instruments, as inaccuracies in column thermostating devices can result in unexpected changes to  $\alpha$ . Strict adherence to the guidelines set forth by Wolcott et al. [39] is mandatory for success in transferring methods when using elevated column  $T$ . We do not advise using polymeric columns without controlling  $T$ .

We found that a two-step procedure for the isolation of pigments for use as standards from a complex matrix was very time efficient and produced products of high quality. A highly efficient monomeric column with low back-pressure and high sample capacity (such as the Supelcosil LC 318  $C_{18}$  column) was useful for the isolation of crudely purified fractions when pigments of interest co-eluted, or for the isolation of well-resolved pigments. Partially purified fractions were subsequently re-injected and the constituent pigments isolated as pure

fractions from columns (primarily polymeric ones) with selectivities that differed from the LC 318  $C_{18}$  column. We isolated 20 different pigments using methods based on these principles.

From our survey of columns (Figs. 3–6), we found the XDB  $C_8$  column combined high efficiency (important to good detectability) and desirable  $\alpha$ . We regret that the additional pigments identified from the analysis of culture extracts (Fig. 7) were not included in the input data from which our  $T$  and  $t_G$  conditions were derived, as we were unable to determine if other conditions would have been more optimal for resolving the pigment pairs observed to co-elute (Table 1) with conditions used. The method described for this column is well suited to the analysis of pigments in dilute or highly concentrated natural samples as the method has excellent detectability and the linear dynamic range extends to the point of detector saturation. The analysis time is convenient (27 min for elution of the most retained pigment). The method uses a simple mobile phase (composed primarily of an inexpensive organic solvent, methanol) and a linear gradient (which contributes to baseline stability). Because the peak shape, and therefore  $R_s$ , of early eluting chlorophylls is affected by injection conditions and injector capabilities, analysts may need to individualize injector programs, ratios of solvent to buffer and injection volumes to achieve similar results for these pigments. This method has been used extensively in our laboratory for the analysis of natural samples and has exhibited excellent column to column reproducibility with regard to  $\alpha$ ,  $R_s$  and response factor stability. This method was recently evaluated in an intercalibration exercise [40] and compared favorably with other methods tested.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge Victor S. Kennedy for encouragement and editing of our manuscript and Hugh MacIntyre for his comments as well; Garry Baptist, Dan Gustafson, Stacy Kane, Aishou Li, Deborah Kennedy and William Severn for algal cultures grown at Horn Point and Robert Vaillancourt and Robert Guillard for sharing data from their algal cultures grown at Provasoli-Guillard Center for

Culture of Marine Phytoplankton (CCMP); Lawrence Harding, Jr. and Ajit Subramaniam for shared data; Ivy Collins and Alan Lewitus for testing the transferability of our method, through EPA grant # R826944-01-0; Agilent Technologies, Phenomenex, The Separations Group, Supelco and YMC for donations of columns; LC Resources, Inc. for their donation of DryLab; Perdue, Inc. for donations of the pigments lutein and canthaxanthin; Lloyd Snyder of LC Resources for his help with improving column heater performance and solving chromatographic problems and for his suggestions and guidance with data analysis and interpretation (Section 3.2); Simon Wright for his assistance with tentative identification of pigments (unknown to us) in *Emiliana huxleyi*; Patricia Glibert (Analytical Services Chairperson) and Thomas Malone (Laboratory Director) for their continuing support of our efforts to improve methods; and the anonymous reviewers. This work was partially funded by ONR award No. N000140010151. This is contribution No. 3381 from the University of Maryland Center for Environmental Science.

## References

- [1] S.W. Jeffrey, S.W. Wright, M. Zapata, *Mar. Freshwat. Res.* 50 (1999) 879.
- [2] M. Olaizola, J. La-Roche, Z. Kolber, P.G. Falkowski, *Photosyn. Res.* 41 (1994) 357.
- [3] G.W. Kraay, M. Zapata, M.J.W. Veldhuis, *J. Phycol.* 28 (1992) 708.
- [4] S.W. Wright, S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77 (1991) 183.
- [5] R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, *Anal. Chim. Acta* 151 (1983) 297.
- [6] S.W. Wright, J.D. Shearer, *J. Chromatogr.* 294 (1984) 281.
- [7] M. Zapata, A.M. Ayala, J.M. Franco, J.L. Garrido, *Chromatographia* 23 (1987) 26.
- [8] L. Van Heukelem, A.J. Lewitus, T.M. Kana, N.E. Craft, *J. Phycol.* 28 (1992) 867.
- [9] L. Van Heukelem, A.J. Lewitus, T.M. Kana, N.E. Craft, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114 (1994) 303.
- [10] J.L. Garrido, M. Zapata, *Chromatographia* 35 (1993) 543.
- [11] J.L. Garrido, M. Zapata, *J. High Res. Chromatogr.* 16 (1993) 229.
- [12] S.L. Strom, *Deep-Sea Res.* 40 (1993) 57.
- [13] J.L. Garrido, M. Zapata, S. Muniz, *J. Phycol.* 31 (1995) 761.
- [14] K. Van Lenning, J.L. Garrido, J. Aristegui, M. Zapata, *Chromatographia* 41 (1995) 539.
- [15] J.L. Garrido, M. Zapata, *J. Chromatogr.* 738 (1996) 285.
- [16] J.L. Garrido, M. Zapata, *Chromatographia* 44 (1997) 43.
- [17] R. Goericke, D.J. Repeta, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101 (1993) 307.
- [18] F. Vidussi, H. Claustre, J. Bustillos-Guzman, C. Cailiau, J.C. Marty, *J. Plankton Res.* 18 (1996) 2377.
- [19] R.G. Barlow, D.G. Cummings, S.W. Gibb, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161 (1997) 303.
- [20] M. Zapata, F. Rodriguez, J.L. Garrido, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195 (2000) 29.
- [21] L.C. Sander, K.E. Sharpless, M. Pursch, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 189.
- [22] H. Schmid, H.B. Stich, *J. Appl. Phycol.* 7 (1995) 487.
- [23] P.L. Zhu, J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordevic, D.W. Hill, J.-T. Lin, L.C. Sander, L. Van Heukelem, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 63.
- [24] J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordevic, D.W. Hill, D.L. Saunders, L. Van Heukelem, T.J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 1.
- [25] S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright (Eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, UNESCO, Paris, 1997, p. 447, Part IV.
- [26] S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright (Eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, UNESCO, Paris, 1997, p. 563, Appendix A.
- [27] A. Li, D.K. Stoecker, J. Adolf, *Aquat. Microb. Ecol.* 19 (1999) 163.
- [28] M.B. Bazzaz, *Photochem. Photobiophys.* 2 (1981) 199.
- [29] D.C. Hurd, D.W. Spencer (Eds.), *Marine Particles: Analysis and Characterization*, American Geophysical Union, Washington, DC, 1991, p. 119, Chapter 4.
- [30] L.C. Sander, S.A. Wise, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1749.
- [31] F. Rodriguez, M. Zapata, J.L. Garrido, *Chromatographia* 48 (1998) 677.
- [32] K.S. Epler, L.C. Sander, R.G. Ziegler, S.A. Wise, N.E. Craft, *J. Chromatogr.* 595 (1992) 89.
- [33] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) 115.
- [34] J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, L. Van Heukelem, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 37.
- [35] S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright (Eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, UNESCO, Paris, 1997, p. 207, Chapter 7.
- [36] J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Wolcott, P. Haber, T. Baczek, R. Kalisz, L.C. Sander, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 41.
- [37] B.F.D. Ghrist, B.S. Cooperman, L.R. Snyder, *J. Chromatogr.* 459 (1988) 1.
- [38] M. Latasa, R.R. Bidigare, M.E. Ondrusek, M.C. Kennicutt II, *Mar. Chem.* 51 (1996) 315.
- [39] R.G. Wolcott, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 211.
- [40] S.B. Hooker, E.R. Firestone (Eds.), Vol. 14, Sessions, 2000: The first SeaWiFS analysis round-robin experiment (SeaHARRE-1), NASA Tech. Memo. 2000-206892, NASA, Greenbelt, MD, in press, SeaHARRE-1.

## **ANEXO B**

### **PRUEBA DE VALORES ATÍPICOS**

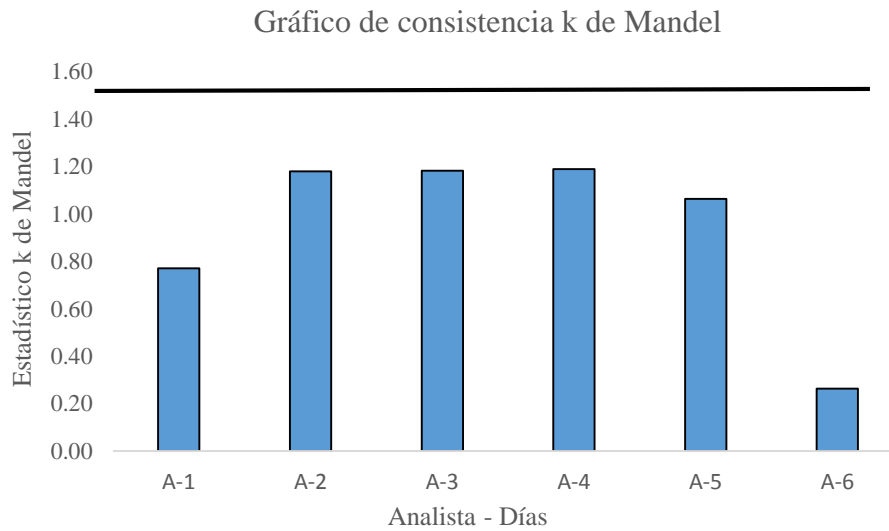
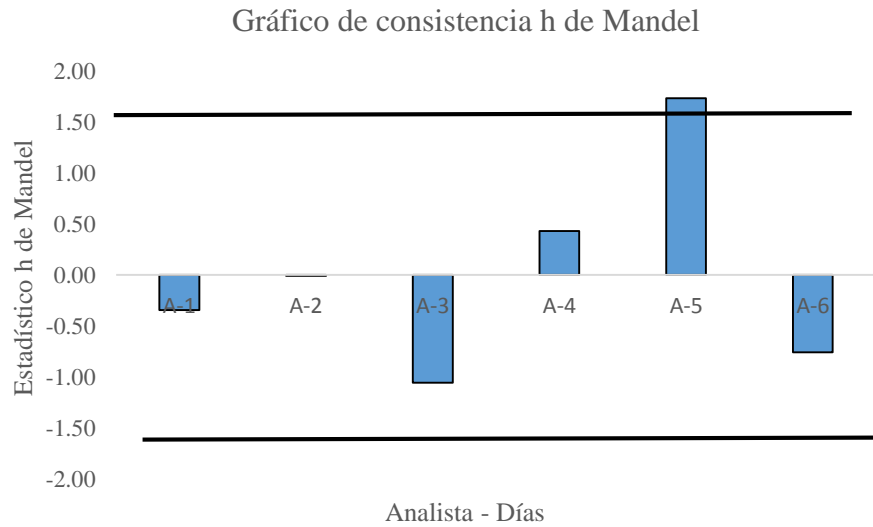
**PRUEBA DE VALORES ATÍPICOS DE LOS VALORES DE PRECISIÓN  
INTERMEDIA DEL MÉTODO ANALÍTICO**

**Valores obtenidos de la cantidad de *All-trans*- $\beta$ -caroteno en  $\mu\text{g/mL}$  de la muestra por el Analista "A" en 6 diferentes días**

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6
Réplica 1	19,082	19,023	18,767	19,155	19,623	19,208
Réplica 2	19,276	19,351	18,979	19,481	19,858	19,195
Réplica 3	19,496	19,650	19,256	19,777	20,135	19,201
Réplica 4	19,617	19,854	19,606	19,997	20,374	19,363
Promedio	19,368	19,470	19,152	19,603	19,998	19,242

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	$h_{A-1}$	$h_{A-2}$	$h_{A-3}$	$h_{A-4}$	$h_{A-5}$	$h_{A-6}$
$h_{\text{exp}}$	-0,34	-0,01	-1,05	0,43	1,73	-0,76
$h_{\text{critico}}(\alpha=0,05)$	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66
	$k_{A-1}$	$k_{A-2}$	$k_{A-3}$	$k_{A-4}$	$k_{A-5}$	$k_{A-6}$
$k_{\text{exp}}$	0,77	1,18	1,18	1,19	1,06	0,26
$k_{\text{critico}}(\alpha=0,05)$	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54



El valor de  $h_{A5}$  no supera la prueba y se le considera un valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin dicho valor.

Valores obtenidos de la cantidad de *All-trans*- $\beta$ -caroteno en  $\mu\text{g/mL}$  de la muestra por el Analista “A” exceptuando el valor de  $h_{A-5}$

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-6
Réplica 1	19,082	19,023	18,767	19,155	19,208
Réplica 2	19,276	19,351	18,979	19,481	19,195
Réplica 3	19,496	19,650	19,256	19,777	19,201
Réplica 4	19,617	19,854	19,606	19,997	19,363
Promedio	19,368	19,470	19,152	19,603	19,242

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel exceptuando el valor de  $h_{A-5}$

	$h_{A-1}$	$h_{A-2}$	$h_{A-3}$	$h_{A-4}$	$h_{A-6}$
$h_{exp}$	0.001	0.57	-1.20	1.32	-0.70
$h_{critico}(\alpha=0,05)$	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57
	$k_{A-1}$	$k_{A-2}$	$k_{A-3}$	$k_{A-4}$	$k_{A-6}$
$k_{exp}$	0.78	1.20	1.20	1.21	0.27
$k_{critico}(\alpha=0,05)$	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54

Gráfico de consistencia h de Mandel

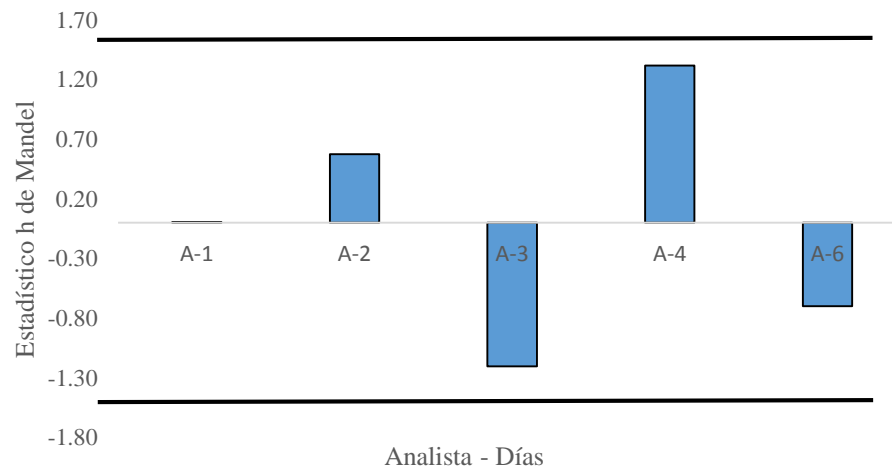
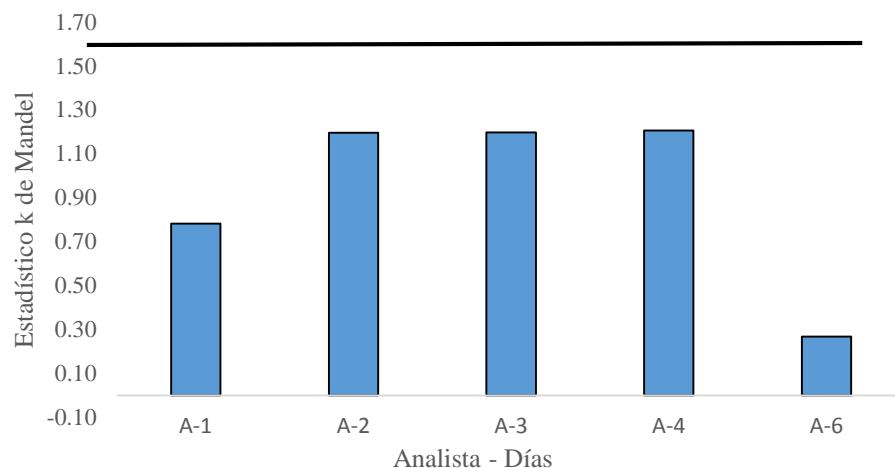


Gráfico de consistencia k de Mandel



Se observa que esta vez si se supera la prueba de consistencia k y h de Mandel.

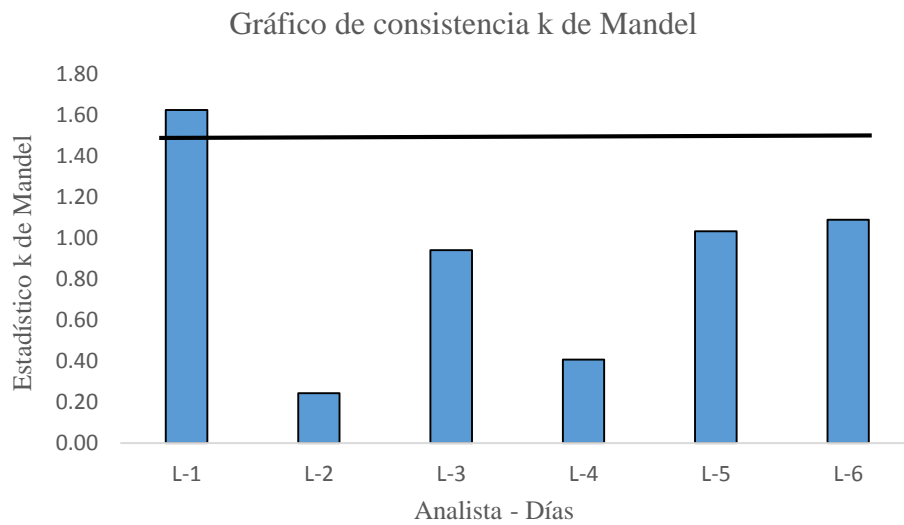
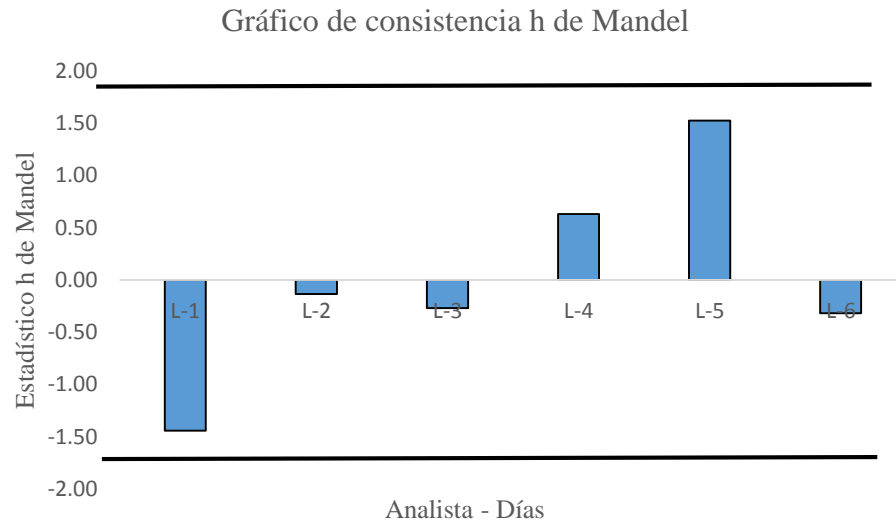
**Valores obtenidos de la cantidad de All-trans- $\beta$ -caroteno en  $\mu\text{g/mL}$  de la muestra por el Analista "L" en 6 diferentes días**

	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6
Réplica 1	18,566	19,078	18,928	19,233	19,404	19,136
Réplica 2	18,826	19,132	19,055	19,286	19,608	18,891
Réplica 3	18,722	19,113	19,164	19,307	19,615	19,043
Réplica 4	18,990	19,078	19,223	19,340	19,428	19,151
Promedio	18,776	19,101	19,093	19,292	19,627	19,056

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h <sub>L-1</sub>	h <sub>L-2</sub>	h <sub>L-3</sub>	h <sub>L-4</sub>	h <sub>L-5</sub>	h <sub>L-6</sub>
h <sub>exp</sub>	-1,44	-0,14	-0,27	0,63	1,53	-0,32
h <sub>critico</sub> ( $\alpha=0,05$ )	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66
	k <sub>L-1</sub>	k <sub>L-2</sub>	k <sub>L-3</sub>	k <sub>L-4</sub>	k <sub>L-5</sub>	k <sub>L-6</sub>
k <sub>exp</sub>	1,62	0,24	0,94	0,41	1,03	1,09
k <sub>critico</sub> ( $\alpha=0,05$ )	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54

El valor de  $k_{B1}$  no supera la prueba y se le considera un valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin dicho valor.



El valor de  $k_{L1}$  no supera la prueba y se le considera un valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin dicho valor.



	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6
Réplica 1	19,078	18,928	19,233	19,404	19,136
Réplica 2	19,132	19,055	19,286	19,608	18,891
Réplica 3	19,113	19,164	19,307	19,615	19,043
Réplica 4	19,078	19,223	19,340	19,428	19,151
Promedio	19,101	19,093	19,292	19,627	19,056

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	$h_{L-2}$	$h_{L-3}$	$h_{L-4}$	$h_{L-5}$	$h_{L-6}$
$h_{exp}$	-0,53	-0,70	0,44	1,56	-0,76
$h_{critico}(\alpha=0,05)$	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
	$k_{L-2}$	$k_{L-3}$	$k_{L-4}$	$k_{L-5}$	$k_{L-6}$
$k_{exp}$	0,30	1,15	0,50	1,26	1,33
$k_{critico}(\alpha=0,05)$	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54

Gráfico de consistencia h de Mandel

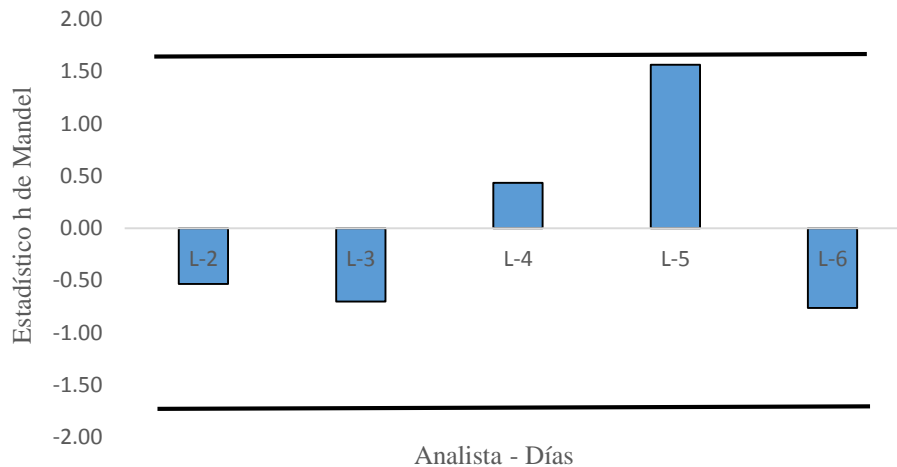
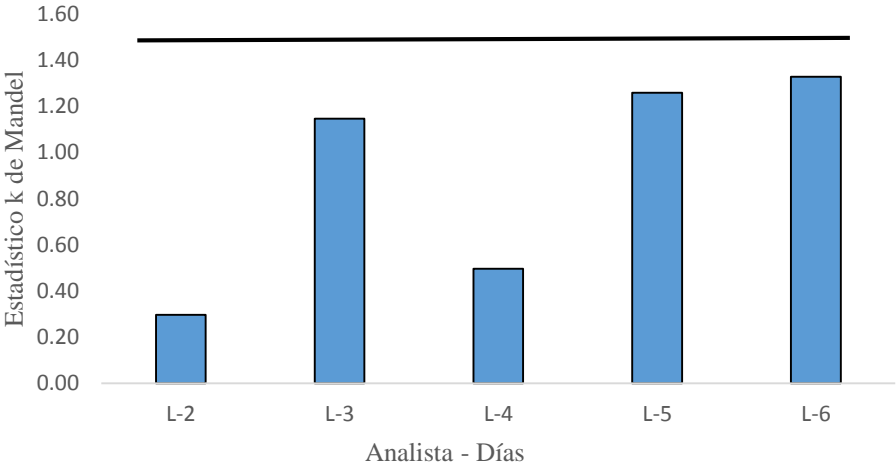


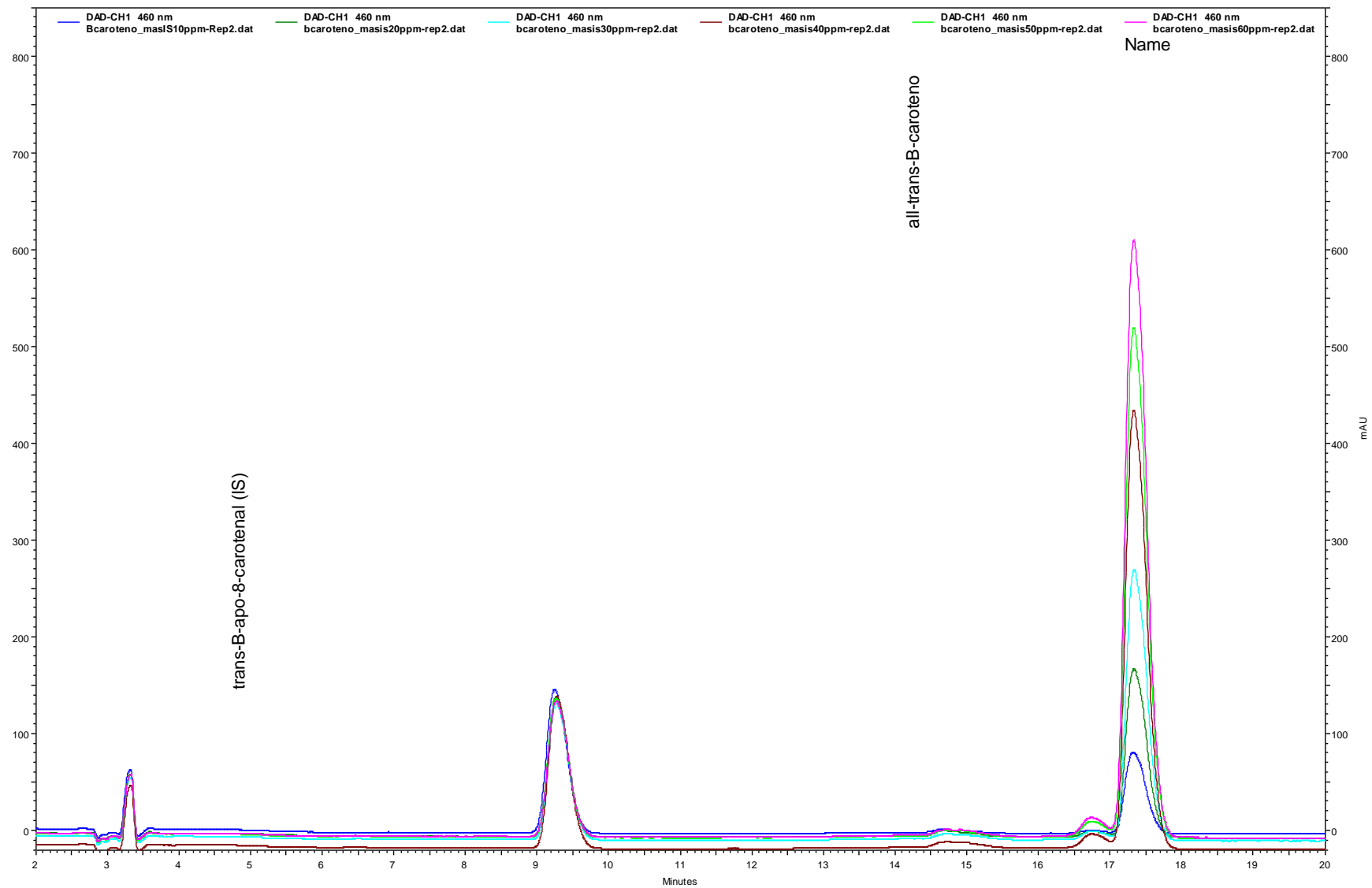
Gráfico de consistencia k de Mandel



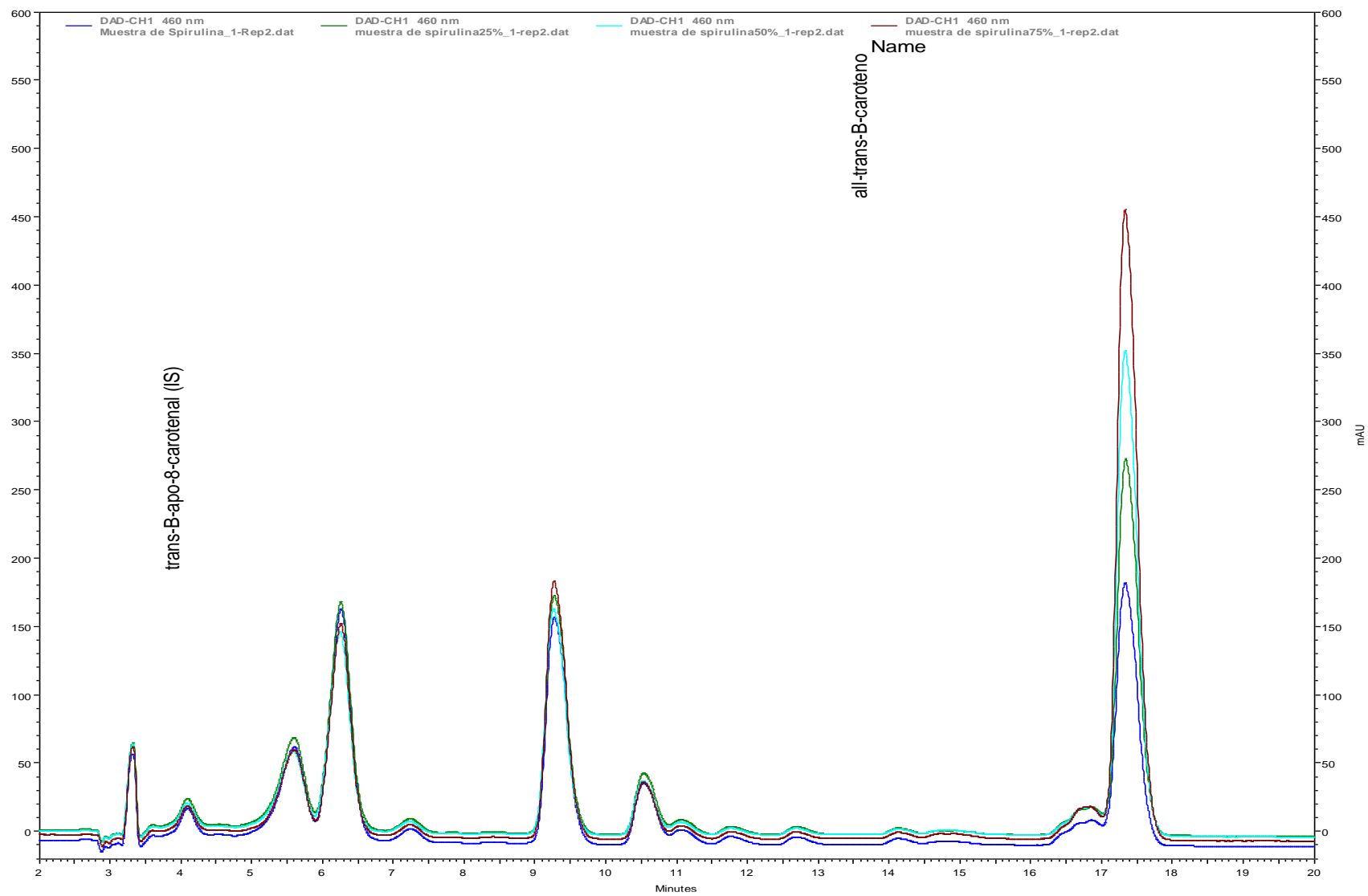
Se observa que esta vez si se supera la prueba de consistencia k y h de Mandel.

## **ANEXO C**

### **CROMATOGRAMAS TÍPICOS DE LA VALIDACIÓN**



Cromatograma típico de la prueba de linealidad del estándar certificado a concentraciones al 50, 100, 150, 200, 250, y 300%



Cromatograma típico de la prueba de Recuperación al 0, 25, 50 y 75% de la concentración estimada del analito

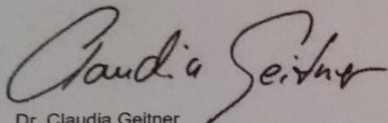
## **ANEXO D**

CERTIFICADOS DE ANÁLISIS Y CALIBRACIÓN

## Certificate of Analysis

Product Name:  $\beta$ -CAROTENE  
BioChemika, purum  
Product Number: 22040  
Batch Number: BCBM8428V  
Brand: Fluka  
CAS Number: 7235-40-7  
Formula: C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>  
Formula Weight: 536.87  
Quality Release Date: 13 MAR 2014  
Recommended Retest Date: JAN 2016

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	RED TO DARK RED	DARK RED
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
MELTING POINT	176 - 184 C	178 C
SOLUBILITY (COLOR)	ORANGE TO RED TO DEEP RED	DEEP RED
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR (< 3.5 NTU)	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	-	0.01G IN 10 ML CHCL <sub>3</sub>
LOSS ON DRYING	≤ 0.2 %	0.01 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
ASSAY (UV)	≥ 97.0 %	98.7 %
REM. ON UV SPECTROSCOPY	A 455/340 >1.50	A455/340-1.72 (PH. EUR.4)
PROOF OF IDENTITY	A455/483 = 1.14 - 1.18	A 455/483-1.15 (PH. EUR. 4)
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	≤ 10 PPM	< 10 PPM



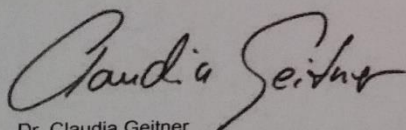
Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Certificate of Analysis

**Product Name:** TRANS- $\beta$ -APO-8'-CAROTENAL  
 >= 96.0 % UV  
**Product Number:** 10810  
**Batch Number:** BCBN8865V  
**Brand:** Sigma  
**CAS Number:** 1107-26-2  
**Formula:** C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O  
**Formula Weight:** 416.64  
**Storage Temperature:** -20 C  
**Quality Release Date:** 12 NOV 2014  
**Recommended Retest Date:** AUG 2015

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	BLUE-BLACK	BLACK
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTAL OR CHUNK(S)	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	≥ 96.0 %	98.0 %
MELTING POINT	137 - 141 C	137 C
SOLUBILITY (COLOR)	RED-ORANGE TO VERY DEEP RED-ORANGE	VERY DEEP RED
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY FAINTLY TURBID (< 12.5 NTU)	CLEAR (<3.5 NTU)
SOLUBILITY (METHOD)	1 MG/ML CHLOROFORM	1 MG/ML CHLOROFORM
LOSS ON DRYING	≤ 0.5 %	< 0.05 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
WAVELENGTH (1) (UV)	458 - 464 NM	460.3 NM
MOLAR ABSORBANCY INDEX (1)	—	105816.2
ASSAY (1) (UV)	96.0 - 102.0 %	96.2 %
SOLVENT (UV)	CHLOROFORM/CYCLOHEXANE	CHLOROFORM/CYCLOHEXANE



Dr. Claudia Geitner  
 Manager Quality Control  
 Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificado de análisis del estándar interno *trans*- $\beta$ -apo-8'-carotenal



Ensayo de pesaje

	Inicial	Final
Temperatura (°C)	22,4	22,2

	Inicial	Final
Humedad Relativa (%)	52,1	51,1

Carga L (g)	CARGA CRECIENTE				CARGA DECRECIENTE				Error Máximo Permissible ± (g)
	I <sub>L</sub> (g)	ΔL (mg)	E (g)	E <sub>c</sub> (g)	I <sub>L</sub> (g)	ΔL (mg)	E (g)	E <sub>c</sub> (g)	
0,00100	0,0011	0	0,00010						
0,01000	0,0100	0	0,00000	-0,00010	0,0101	0	0,00010	0,00000	0,001
20,00000	19,9999	0	-0,00010	-0,00020	20,0000	0	0,00000	-0,00010	0,001
40,00001	39,9999	0	-0,00011	-0,00021	40,0000	0	-0,00001	-0,00011	0,001
59,99996	59,9999	0	-0,00006	-0,00016	60,0000	0	0,00004	-0,00006	0,002
69,99997	69,9999	0	-0,00007	-0,00017	70,0000	0	0,00003	-0,00007	0,002
79,99997	79,9999	0	-0,00007	-0,00017	79,9999	0	-0,00007	-0,00017	0,002
99,99985	99,9998	0	-0,00005	-0,00015	99,9997	0	-0,00015	-0,00025	0,002
119,99985	119,9996	0	-0,00025	-0,00035	119,9995	0	-0,00035	-0,00045	0,002
149,99982	149,9994	0	-0,00042	-0,00052	149,9993	0	-0,00052	-0,00062	0,002
220,00004	219,9988	0	-0,00124	-0,00134	219,9988	0	-0,00124	-0,00134	0,003

L : Carga puesta sobre la balanza  
 I<sub>L</sub> : Lectura de la balanza  
 E : Error encontrado  
 E<sub>0</sub> : Error en cero  
 E<sub>c</sub> : Error corregido  
 ΔL : Carga incrementada

LECTURA CORREGIDA E INCERTIDUMBRE DE LA BALANZA

INCERTIDUMBRE EXPANDIDA DE MEDICIÓN  $U_R = 2 \sqrt{1,8E-08 + 4,6E-11 \times R^2} \text{ g}$

LECTURA CORREGIDA DE LA BALANZA ( g )  $R \text{ corregida} = R + 3,4E-06 \times R$

R = Lectura de la balanza despues de la calibración ( g ) .

La incertidumbre expandida de la medición se ha obtenido multiplicando la incertidumbre estandar de la medición por el factor de cobertura k = 2 que, para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente 95%.



N° PE14-0041

**PATRONES UTILIZADOS**

Standards Used

Valor/Clase Value / Class	Código de patrón Standard code	N° de Certificado certificate number	Trazabilidad Traceability
1 mg a 200 g / E1	PTP-STE1-01	G1-224 DKD-K-11801	KERN & SOHN GMBH

**CONDICIONES AMBIENTALES DURANTE LA CALIBRACIÓN**

Environment Conditions during Calibration

Temperatura Inicial: Initial Temperature	20,9 °C	Humedad Inicial: Initial Humidity	51,4 %	Presión Inicial: Initial Pressure	996,7 mbar
Temperatura Final: Final Temperature	21,2 °C	Humedad Final: Final Humidity	50,8 %	Presión Final: Final Pressure	995,4 mbar

**RESULTADOS**

Standards Used

Valor Nominal Nominal Value	Marcas Marks	Masa Convencional Conventional Mass	Incertidumbre Uncertainty	Material Material	Forma Shape	Densidad Density
1 mg	Ninguna	1 mg + 0,002 mg	0,002 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
2 mg	Ninguna	2 mg + 0,001 mg	0,002 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
2 mg	(-)	2 mg + 0,002 mg	0,002 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
5 mg	Ninguna	5 mg + 0,000 mg	0,002 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
10 mg	Ninguna	10 mg + 0,000 mg	0,003 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
20 mg	Ninguna	20 mg + 0,002 mg	0,003 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
20 mg	(-)	20 mg + 0,003 mg	0,003 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
50 mg	Ninguna	50 mg - 0,001 mg	0,004 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
100 mg	Ninguna	100 mg + 0,002 mg	0,005 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
200 mg	Ninguna	200 mg + 0,007 mg	0,006 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
200 mg	(-)	200 mg + 0,006 mg	0,006 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
500 mg	Ninguna	500 mg + 0,002 mg	0,008 mg	Acero inoxidable	Alambre	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
1 g	BG5	1 g + 0,012 mg	0,010 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
2 g	BP9	2 g + 0,015 mg	0,012 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
2 g	BPA	2 g + 0,000 mg	0,012 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
5 g	BSW	5 g + 0,018 mg	0,016 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
10 g	B81	10 g + 0,013 mg	0,020 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
20 g	BN0	20 g + 0,021 mg	0,025 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
20 g	BMZ	20 g + 0,040 mg	0,025 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
50 g	B8H	50 g - 0,03 mg	0,03 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
100 g	BER	100 g + 0,03 mg	0,05 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
200 g	BQG	200 g + 0,13 mg	0,10 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³
200 g	BQJ	200 g + 0,07 mg	0,10 mg	Acero inoxidable	Cilíndrica con botón	7950 kg/m³ ± 140 kg/m³

**INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN**

Measurement Uncertainty

La incertidumbre de medición calculada ( $U$ ), ha sido determinada a partir de la incertidumbre estándar de medición combinada, multiplicada por el factor de cobertura  $K=2$ . Este valor ha sido calculado para un nivel de confianza del 95,45%.

The calculated uncertainty of measurement ( $U$ ), it has been determined from the combined Standard Uncertainty of Measurement multiplied by the coverage factor  $K=2$ . This value has been calculated for a confidence level of 95,45 %.



## **ANEXO E**

### **FOTOGRAFÍAS**



Muestra de microalga *Arthrospira platensis*  
liofilizada



Extracto de la muestra Acetona conteniendo el  
estándar interno



Viales ámbar con filtro PTFE 0,45  $\mu$ m para HPLC



Posicionamiento y lectura de las muestras por  
HPLC-DAD

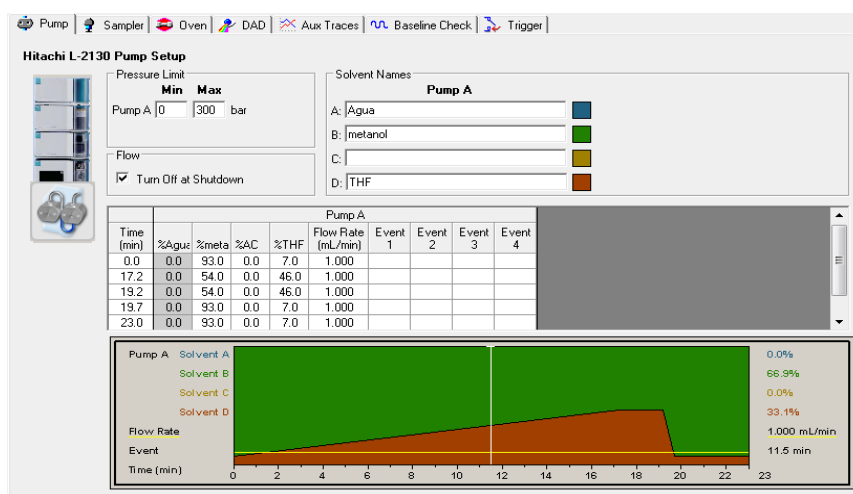




Estándar de All-*trans*-β-carotene y Estándar interno de *trans*-β-Apo-8'-carotenal



Pesas patrones de 1 mg a 200 g - clase E2



Rampa de elución del método analítico usando el software EZChrom Elite Ver. 3.2.1