



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico, para la cuantificación de delta y gamma tocotrienol presentes en las semillas de *Bixa orellana* de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Condolo Macas, Pablo Simeón.

DIRECTOR: Ojeda Riascos, Edgar Santiago, M. Sc.

LOJA - ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

M. Sc.

Edgar Santiago Ojeda Riascos.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico, para la cuantificación de delta y gamma tocotrienol presentes en las semillas de *Bixa orellana* de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas** realizado por **Condolo Macas Pablo Simeón** ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Enero de 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Condolo Macas Pablo Simeón declaro ser autor del presente trabajo de Titulación: **Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico, para la cuantificación de delta y gamma tocotrienol presentes en las semillas de *Bixa orellana* de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo **Edgar Santiago Ojeda Riascos** director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....
Autor: Pablo Simeón Condolo Macas
Cédula: 1104764954

DEDICATORIA

El actual trabajo de fin de titulación va dedicado en primer lugar a Dios, por ser el motor principal en mi vida, por su infinito amor y su inmensa gracia, por guiarme en cada paso que he dado en todos estos años y por ser la razón de mi vida.

A mis amados padres Walter Condolo y Marianela Macas, por todo su amor y bondad, por confiar en mí, por apoyarme moral y económicamente durante todo este tiempo de estudio, por guiarme en el buen camino de la vida con sus ejemplares valores y enseñanzas, gracias a ustedes he logrado cumplir una de las tantas metas que aún me quedan.

A mis queridos hermanos Carlos y Josué por su gran colaboración en cada momento en que los necesité.

A mis sobrinos Carlos, Alberto y David, quienes me han inspirado a ser una mejor persona y ser un gran ejemplo en su vida.

A toda mi familia en general ya que de una u otra manera cada uno ha puesto su granito de arena en este proceso.

A todos mis buenos amigos, en especial a Jefferson, Toño, Rafael, John, César, Lisseth quienes han sido partícipes de grandes momentos en mi vida.

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”. Filipenses 4:13.

Pablo Simeón Condolo Macas

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios, por estar siempre a mi lado, por darme salud y vida para poder cumplir sus propósitos en mi vida.

A mis padres Walter Condolo y Marianela Macas, por todo su apoyo en este proceso.

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja por su apertura a mi formación académica, a la titulación de Bioquímica y Farmacia por sus enseñanzas durante todos estos años de estudio.

Al Departamento de Química por la disponibilidad de sus laboratorios para realizar el presente trabajo.

A los docentes: Ing. James Calva, Ing. Paulo Cedeño, Ing. Diego Maza, Dr. Omar Malagón e Ing. Natali Solano, por su ayuda brindada en la realización de este trabajo.

A mi director de tesis: M. Sc. Santiago Ojeda por su guía y dedicación en el presente trabajo y por sus enseñanzas en las aulas.

A todo el personal de la UTPL en general.

“Porque somos hechura suya, creados en Cristo Jesús para buenas obras, las cuales Dios preparó de antemano para que anduviésemos en ellas”. Efesios 2:10.

Pablo Simeón Condolo Macas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	6
MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Antecedentes	7
1.1.1. Medicina Tradicional y uso de Plantas Medicinales.	7
1.1.2. Plantas Medicinales en el Ecuador.	7
1.2. <i>Bixa orellana</i>	8
1.2.1. Descripción botánica.....	8
1.2.2. Usos.	9
1.2.2.1 Industrial.....	9
1.2.2.2. Medicinal Tradicional.....	10
1.2.3. Composición Química.	10
1.2.3.1. Bixina.	10
1.2.3.2. Vitamina E y Tocotrienoles.	10
1.2.3.2.1. Delta Tocotrienol (DT3).....	11
1.2.3.2.2. Gamma Tocotrienol (GT3).	12
1.2.4. Actividad Biológica.....	12
1.3. Extracción de materias primas vegetales	12
1.3.1. Molienda o trituración.....	13
1.3.2. Maceración.	13
1.4. Validación de métodos analíticos	13
1.4.1. Fin.....	13
1.4.2. Parámetros.	14
1.4.2.1. Especificidad.	14

1.4.2.2. Linealidad.....	14
1.4.2.3. Límite de cuantificación (LOQ).	14
1.4.2.4. Límite de detección (LOD).....	14
1.4.2.5. Exactitud.	15
1.4.2.6. Precisión.	15
1.4.2.7. Repetibilidad.....	15
1.4.2.8. Reproducibilidad.....	15
1.4.2.9. Recuperación.	15
1.5. Derivatización.....	16
1.5.1. Sililación vía N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA).	16
1.6. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	16
1.6.1. Tipos de detectores.	17
1.6.1.1. Detector de Ionización de Llama (DIL).....	17
1.6.1.2. Detector de Conductividad Térmica (DCT).	17
1.6.1.3. Detector de Captura de Electrones (DCE).....	17
CAPÍTULO II	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. Tratamiento de las muestras de <i>Bixa orellana</i>	20
2.1.1. Recolección, secado y trituración de 120 muestras de <i>Bixa orellana</i>	20
2.1.2. Extractos de <i>B. orellana</i> a través de maceración dinámica.	20
2.1.3. Preparación de las muestras a partir de los extractos.	20
2.2. Validación del método analítico	21
2.2.1. Preparación de soluciones: madre, estándar interno, muestra.....	21
2.2.1.1. Preparación de delta tocotrienol.	21
2.2.1.2. Preparación de gamma tocotrienol.	21
2.2.1.3. Preparación de alfa tocoferol.	21
2.2.1.4. Preparación de muestra.	21
2.2.2. Método Analítico.	21
2.2.2.1. Linealidad.....	22
2.2.2.1.1. Linealidad (preparación de muestras para la curva).	22
2.2.2.2. Preparación de alícuota del Estándar Interno (SI).	22
2.2.2.3. Preparación de muestras para la lectura en el Cromatógrafo de gases....	22
2.2.2.4. Límites.....	23
2.2.2.4.1. Límites de cuantificación.....	23

2.2.2.4.2. Límites de detección.	23
2.2.2.5 Exactitud	23
2.2.2.6. Precisión.	24
CAPITULO III	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1. Extractos de <i>B. orellana</i>	26
3.2. Validación del Método Analítico.....	28
3.2.1. Linealidad.	28
3.2.1.1. δ -tocotrienol.....	28
3.2.1.2. γ -tocotrienol.	29
3.2.2. Límites detección (LOD) y Límites de cuantificación (LOQ).	31
3.2.2.1. δ -tocotrienol.....	31
3.2.2.2 γ -tocotrienol	31
3.2.3. Precisión.	32
3.2.3.1. δ -tocotrienol.....	33
3.2.3.2. γ -tocotrienol.	33
3.2.4. Exactitud.	34
3.2.4.1. δ -tocotrienol.....	35
3.2.4.2. γ -tocotrienol.	36
3.3. Aplicación del método analítico en los extractos de <i>Bixa orellana</i>	36
3.3.1. Resumen general de las muestras con mayor y menor concentración de δ y γ - tocotrienol.	37
CONCLUSIONES.....	40
RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS	45
ANEXO I: Especificidad del método.	46
ANEXO II: Diagrama para la elaboración del método analítico.	47
ANEXO III: Relación δ y γ-tocotrienol sobre α-tocoferol.	48
ANEXO IV: Datos para calcular los límites máximos y mínimos de la curva de calibración.....	50
Anexo V: Repetibilidad y Reproducibilidad, ANOVA.	53
Anexo VI: Recuperación de δ y γ-tocotrienol.....	59
ANEXO VII: Concentración de δ y γ-tocotrienol en los extractos de <i>Bixa orellana</i> por sectores.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Bixa orellana</i>	8
Tabla 2. Condiciones de trabajo del equipo de GC-MS.	23
Tabla 3. Rendimiento porcentual de extractos con mayor concentración de δ -tocotrienol.	26
Tabla 4. Rendimiento porcentual de extractos con mayor concentración de γ -tocotrienol.	27
Tabla 5. Rendimiento porcentual de extractos con menor concentración de δ -tocotrienol.	27
Tabla 6. Rendimiento porcentual de extractos con menor concentración de γ -tocotrienol.	27
Tabla 7. Valores de δ -tocotrienol para la curva de calibración.....	29
Tabla 8. Valores de γ -tocotrienol para la curva de calibración.	30
Tabla 9. Valores de la concentración más baja para determinar LOD y LOQ de δ - tocotrienol.	31
Tabla 10. Valores de la concentración más baja para determinar LOD y LOQ de γ - tocotrienol.	32
Tabla 11. Porcentaje de Repetibilidad de δ -tocotrienol.....	33
Tabla 12. Porcentaje de Reproducibilidad de δ -tocotrienol.....	33
Tabla 13. Análisis ANOVA de δ -tocotrienol.	33
Tabla 14. Porcentaje de Repetibilidad de γ -tocotrienol.	34
Tabla 15. Porcentaje de Reproducibilidad de γ -tocotrienol.	34
Tabla 16. Análisis ANOVA de γ -tocotrienol.....	34
Tabla 17. Porcentajes de Recuperación de δ -tocotrienol.....	35
Tabla 18. Porcentajes de Recuperación de γ -tocotrienol.	36
Tabla 19. Muestras con mayor concentración de δ -tocotrienol por sector.	37
Tabla 20. Muestras con mayor concentración de γ -tocotrienol por sector.....	37
Tabla 21. Muestras con menor concentración de δ -tocotrienol por sector.	38
Tabla 22. Muestras con menor concentración de γ -tocotrienol por sector.....	38
Tabla 23. Tiempos de retención y pesos moleculares de δ y γ -tocotrienol y de α -tocoferol.	46
Tabla 24. Relación δ -tocotrienol sobre α -tocoferol.....	48
Tabla 25. Relación γ -tocotrienol sobre α -tocoferol.	49
Tabla 26. Datos para determinar los límites máximos y mínimos de δ -tocotrienol.	50

Tabla 27. Datos para determinar los límites máximos y mínimos de γ -tocotrienol.....	51
Tabla 28. Datos de réplicas de la concentración 3 ng/uL de δ -tocotrienol.	53
Tabla 29. Datos de réplicas de la concentración 7,55 ng/uL de δ -tocotrienol.	54
Tabla 30. Datos de réplicas de la concentración 46,88 ng/uL de δ -tocotrienol.....	55
Tabla 31. Datos de réplicas de la concentración 1,375 ng/uL de γ -tocotrienol.	56
Tabla 32. Datos de réplicas de la concentración 8,594 ng/uL de γ -tocotrienol.	57
Tabla 33. Datos de réplicas de la concentración 21,484 ng/uL de γ -tocotrienol.	58
Tabla 34. Datos para determinar la Recuperación de δ y γ -tocotrienol.	59
Tabla 35. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Jamboé.....	60
Tabla 36. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Los Encuentros.....	61
Tabla 37. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Paltas.	62
Tabla 38. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Podocarpus.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de <i>Bixa orellana</i>	9
Figura 2. Estructura de delta tocotrienol.....	11
Figura 3. Estructura de gamma tocotrienol.....	12
Figura 4. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.....	18
Figura 5. Linealidad de δ -tocotrienol.....	29
Figura 6. Linealidad de γ -tocotrienol.....	30
Figura 7. Recuperación de δ -tocotrienol.....	35
Figura 8. Recuperación de γ -tocotrienol.....	36
Figura 9. Cromatograma de δ y γ -tocotrienol y α -tocoferol.....	46
Figura 10. Análisis ANOVA de la concentración 3 ng/uL de δ -tocotrienol.....	53
Figura 11. Análisis ANOVA de la concentración 7,55 ng/uL de δ -tocotrienol.....	54
Figura 12. Análisis ANOVA de la concentración 46,88 ng/uL de δ -tocotrienol.....	55
Figura 13. Análisis ANOVA de la concentración 1,375 ng/uL de γ -tocotrienol.....	56
Figura 14. Análisis ANOVA de la concentración 8,594 ng/uL de γ -tocotrienol.....	57
Figura 15. Análisis ANOVA de la concentración 21,484 ng/uL de γ -tocotrienol.....	58

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración de δ -tocotrienol y γ -tocotrienol en diferentes extractos de las semillas de *Bixa orellana* colectadas en 4 lugares distintos de la zona sur del Ecuador (Loja y Zamora Chinchipe), a través de la aplicación de un método analítico en GC-MS. El método desarrollado cumple con los parámetros establecidos de linealidad (δ -tocotrienol ($r^2= 0,9992$), γ -tocotrienol ($r^2= 0,9996$)), límite de detección (δ -tocotrienol 5,86 ng/uL, γ -tocotrienol 1,04 ng/uL), y límite de cuantificación (δ -tocotrienol 8,10 ng/uL, γ -tocotrienol 1,50 ng/uL). La precisión se determinó a través de la repetibilidad y reproducibilidad cuyos resultados fueron inferiores al 10% y 15%, respectivamente. La exactitud del método se evaluó mediante la recuperación en donde para δ -tocotrienol estuvo entre 90%-119%, y para γ -tocotrienol entre 93%-120%. El método fue aplicable para las zonas de Jamboé, Los Encuentros, El Podocarpus (Zamora Chinchipe) y Paltas (Loja). Como resultado final se obtuvo que la zona con la mayor concentración promedio de δ -tocotrienol fue: Los Encuentros con 62,2889 ng/uL; mientras que la zona con la mayor concentración promedio de γ -tocotrienol fue: El Podocarpus con 11,0660 ng/uL.

Palabras Clave: *Bixa orellana*, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol, método analítico, GC-MS.

ABSTRACT

The aim of the present work was to determine the concentration of δ -tocotrienol and γ -tocotrienol in different extracts of *Bixa orellana* seeds collected in 4 different locations in the southern region of Ecuador (Loja and Zamora Chinchipe), through the application of an analytical method in GC-MS. The developed method complies with the established parameters of linearity (δ -tocotrienol ($r^2= 0,9992$), γ -tocotrienol ($r^2= 0,9996$)), limit of detection (δ -tocotrienol 5,86 ng/uL, γ -tocotrienol 1,04 ng/uL), and limit of quantification (δ -tocotrienol 8,10 ng/uL, γ -tocotrienol 1,50 ng/uL). The accuracy was determined through repeatability and reproducibility whose results were lower than 10% and 15%, respectively. The accuracy of the method was evaluated through the recovery where for δ -tocotrienol it was between 90% -119%, and for γ -tocotrienol between 93% -120%. The method was applicable for the areas of Jamboé, Los Encuentros, El Podocarpus (Zamora Chinchipe) and Paltas (Loja). As a final result it was obtained that the area with the highest average concentration of δ -tocotrienol was: Los Encuentros with 62,2889 ng / uL; while the area with the highest average concentration of γ -tocotrienol was: El Podocarpus with 11,0660 ng / uL.

Key Words: *Bixa orellana*, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol, analytical method, GC-MS.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos se ha usado compuestos naturales sean de origen mineral, animal o vegetal para el tratamiento de distintas enfermedades (Vilar et al., 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera que de los más de 7.000 millones de habitantes del planeta, el 80% usan y confían en el tratamiento con plantas medicinales para tratar distintas complicaciones de salud (Burneo, 2012).

El árbol o arbusto pequeño de *Bixa orellana* (achiote) corresponde a la familia Bixaceae del género *Bixa*. Las semillas de *B. orellana* generalmente son de color rojo-naranja oscilan de entre 0,3 a 0,5 cm de alto y 0,2 a 0,3 cm de ancho, con formas variadas entre piramidal y cónica (Vilar et al., 2014). Según Alonso (2004) “cada cápsula (fruto) bivalvar de *B. orellana*, contiene una media de 30 a 60 semillas”.

B. orellana, contiene varios compuestos entre ellos están la bixina (cis y trans) con trazas de norbixina, bixina éster de dimetilo y apocarotenoides. La bixina es el principal compuesto en el extracto de achiote (Cosentino, Takinami, & del Mastro, 2016). Varias investigaciones afirman que en las semillas *B. orellana* se han encontrado compuestos como los tocotrienoles (Barrie Tan & Sunderland, 2003). Se ha demostrado que el extracto de achiote previene la peroxidación de lípidos, como agente antioxidante, a través de la acción de tocotrienoles y bixina, protegiendo grasas insaturadas contra daños oxidativos (Moraes, Zobot, & Meireles, 2015).

La vitamina E está compuesta por ocho compuestos de origen natural, cuatro de ellos son tocoferoles que tienen una cola de hidrocarburo saturado y los otros cuatro son tocotrienoles que tienen tres dobles enlaces trans en la cola de hidrocarburos. En los últimos años se ha confirmado que los tocotrienoles (δ -tocotrienol y γ -tocotrienol) presentan efectos positivos para la salud como la radioprotección y radiomitigación que no se evidencian en los tocoferoles (Compadre et al., 2015).

Investigaciones sugieren diversos mecanismos por los que δ -tocotrienol y γ -tocotrienol desempeñan efectos radioprotectores, también se detalla mejora de la actividad de eNOS (sintasa de óxido nítrico endotelial) regulando la disponibilidad de tetrahidrobiopterina; así como la prevención de daños al ADN de células madre y progenitoras hematopoyéticas a través del estímulo de las vías de supervivencia mTOR (Compadre et al., 2015).

En una investigación realizada se sometió a varios ratones a una dosis de radiación (8,5 Gy y 9,5 Gy), previo a esto, a un grupo de ratones se les administró 200 mg/kg de peso corporal de

extracto de achiote, el cual contenía un total de 60% de delta y gamma tocotrienol, los cuales tuvieron una respuesta de supervivencia del 100% mientras que a los que no se administró la dosis de extracto tuvieron un 0% de supervivencia, así este estudio sugiere que el extracto estéril de achiote es una gran y accesible fuente de tocotrienoles, pero lo más importante es que poseería la capacidad de combatir la radiación en seres humanos (Pineda, 2015).

Desafortunadamente el proceso para purificar δ -tocotrienol y γ -tocotrienol es dificultoso y costoso, la mayoría de aceites que contienen cantidades ricas de tocotrienoles también contienen cantidades similares de tocoferoles, lo que obstaculizaría con la biodisponibilidad y bioactividad de tocotrienoles (Compadre et al., 2015).

Por estas razones es que en el presente estudio se aspira a contribuir con datos informativos para actividades de colección y conservación de esta especie, así como también proveer de información para la óptima explotación de metabolitos secundarios al proyecto de investigación: “Estudios para colección, conservación y aprovechamiento de especies vegetales de interés medicinal en la región sur del Ecuador”, a través del desarrollo y validación de un método analítico con GC-MS para determinar las concentraciones de tocotrienoles en distintos especímenes de *B. orellana*, obteniendo así un barrido de datos con los que se podrá definir en qué lugar de la región sur del Ecuador los especímenes presentan una mayor concentración de compuestos (δ -tocotrienol y γ -tocotrienol), de tal manera que en un futuro se pueda aprovechar las diversas actividades terapéuticas mencionadas anteriormente de los mismos, mediante el desarrollo de distintas formas farmacéuticas para uso humano.

Por tanto, el presente estudio responde al fin: “Determinar cuantitativamente la presencia de tocotrienoles en la semillas de *Bixa orellana* mediante el desarrollo de un método analítico validado, con la finalidad de evaluar el rendimiento de los mismos en distintos especímenes.”, y se propone: “Establecer la concentración de tocotrienoles en las semillas de especímenes de *Bixa orellana* colectados en dos provincias del sur del Ecuador mediante el empleo de un método analítico validado”. Los objetivos para lograr el propósito planteado son:

- a) Determinar un procedimiento de obtención de extractos de *B. orellana*, ricos en tocotrienoles.
- b) Diseñar un método analítico para la cuantificación de tocotrienoles en semillas de *B. orellana*, utilizando GC-MS.
- c) Comprobar la robustez del método diseñado a través de los parámetros de recuperación, linealidad, exactitud y precisión, límite de detección y cuantificación.

- d) Realizar un análisis en GC-MS de la concentración de tocotrienoles dentro de extractos obtenidos de *B. orellana* mediante la aplicación del método analítico validado, para determinar el rendimiento de los mismos.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

1.1.1. Medicina Tradicional y uso de Plantas Medicinales.

La medicina tradicional es definida por la OMS como la agrupación de aptitudes, conocimientos y prácticas basadas en hipótesis, afirmaciones y experiencias ancestrales de diversas culturas, a través del uso de medicina de origen mineral, animal y vegetal, utilizadas para el diagnóstico, prevención y tratamiento de distintas patologías (González, 2015). Según la OMS (2003): “Las medicinas tradicionales sean complementarias o alternativas suelen usarse para el tratamiento o prevención de dolencias y enfermedades de tipo crónico de tal forma que se pueda mejorar la calidad de vida de las personas” (OMS, 2003).

La medicina tradicional sigue siendo importante a la hora de aplicar tratamientos ante diferentes patologías, ya que la evolución de medicamentos aún sigue dependiendo de la aplicación de métodos sofisticados para el aprovechamiento de plantas medicinales, lo que significa que la producción de medicamentos sigue dependiendo de plantas medicinales como materia prima (González, 2015), tanto como agentes terapéuticos, así como también materiales de base para sintetizar medicamentos (OMS, 2000). En países como China, Cuba, Tailandia, etc., tienen escrito en sus programas de salud, el uso de plantas medicinales, lo que facilita el tratamiento de diversas patologías (Castro, 2006).

1.1.2. Plantas Medicinales en el Ecuador.

Los habitantes ecuatorianos en su cotidianidad emplean tratamientos para distintas patologías a través de plantas medicinales, principalmente habitantes de la zona rural, pero también por personas de toda clase social. Según investigaciones realizadas se prevé que el 8% de la población ecuatoriana aplica la medicina tradicional, dado que se ha comprobado que varios de los principios activos son una alternativa eficaz en el tratamiento de distintas enfermedades. Existen alrededor de 3118 especies que pertenecen a 206 familias de plantas, las cuales se usan con fines medicinales, de éstas el 75% son plantas nativas y el 5% son endémicas, el 11% son introducidas, el 16% son cultivadas y tienen también otros fines. Del 100% de las especies medicinales, el 26% se usan para el tratamiento de infecciones e infestaciones, la mayor parte de esta categoría son usadas para eliminar parásitos intestinales (lombrices y amebas) (Burneo, 2012).

1.2. *Bixa orellana*

Planta nativa de Brasil, aunque también crece en otras regiones tanto de Centro como de Sur América. Crece en climas tropicales como los de México, Perú, Ecuador, Kenia, India, Indonesia y el este de África. Los nombres comunes más usados para esta especie son achiote, bija, urucu. El árbol o arbusto pequeño de achiote corresponde a la familia Bixaceae del género *Bixa*, existen varias especies, siendo la más común *Bixa orellana* L., en honor a Francisco Orellana, primer europeo en navegar por las aguas del Amazonas (Silva, Amaral, & Reboucas, 2010). Crece en clima cálido y húmedo, con una media de 20°C a 26°C de temperatura, hasta una altura de aproximadamente 2000 m s. n. m., su producción y crecimiento puede darse en la mayoría de suelos, siendo los más propicios; suelos neutros, drenados y ligeramente alcalinos

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Bixa orellana*.

Reino	Plantae
División	Magnoliofita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Bixaceae
Género	<i>Bixa</i>
Especie	<i>Bixa orellana</i> L

Fuente: (González, 1992).

Elaboración: El Autor.

1.2.1. Descripción botánica.

El árbol o arbusto pequeño de *Bixa orellana* (achiote) corresponde a la familia Bixaceae del género *Bixa*, mide de 3 a 5 metros de altura, algunas veces podría alcanzar una elevación de 10 metros. El tronco mide de entre 20 a 30 centímetros de diámetro, presenta una corteza gris, con lenticelas en hileras verticales. Las hojas tienen un diámetro de 10 a 20 centímetros y un extendido de 5 a 10 centímetros, color verde y pecíolos extensos. Las semillas (figura 1) generalmente son de color rojo-naranja oscilan de entre 0,3 a 0,5 centímetros de alto y 0,2 a 0,3 centímetros de ancho, con formas variadas entre piramidal y cónica (Vilar et al., 2014). Según Alonso (2004) “cada cápsula (fruto) bivalvar de *B. orellana*, contiene una media de 30 a 60 semillas”.



Figura 1. Semillas de *Bixa orellana*.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

1.2.2. Usos.

1.2.2.1 Industrial.

Su uso ha sido estimulado por la prohibición del uso de colorantes sintéticos tanto en alimentos como en cosméticos, siendo este de los escasos colorantes que son aceptados por la OMS, debido a que, además de no ser tóxicos, parece no alterar el valor de la comida. Otro hecho interesante es que el 70% de todos los colorantes naturales consumidos en todo el mundo son derivados del achiote. Las semillas de *Bixa orellana L.*, son consideradas como la parte de la planta con mayor importancia comercial, ya que es en el pericarpio (capa que rodea las semillas) en donde se encuentran almacenados los pigmentos, los cuales tienen una extensa aplicación industrial (Vilar et al., 2014). Aproximadamente el 80% del total de los pigmentos pertenece a la bixina, un carotenoide que tiene la propiedad de colorante. Dependiendo del cultivo y las condiciones climáticas de cada región, el contenido de bixina podría variar de 1 a 6% en el arilo de semilla (Franco, Fabri, Barreiro, Manfiolli & Rucker, 2008).

Dentro de la industria tiene distintos usos entre ellos destacan; la producción de alimentos para consumo humano (para el color de la mantequilla, margarina, mayonesa, salsas, mostaza, salchicha, sopa, jugo, helado, productos de panadería, macarrones y queso), industrias de cosméticos, tintorería, cerámica, barnices y culinaria, etc., (Carrillo, 2016).

1.2.2.2. Medicinal Tradicional.

Las semillas de achiote se han utilizado como condimento, así también como: laxante, cardiotónico, expectorante y antibiótico. Además, presenta actividad anti-inflamatoria para moretones y heridas. La infusión de las hojas ha demostrado eficacia contra la bronquitis, el dolor de garganta y la inflamación ocular. Las semillas trituradas (polvo) se han usado como afrodisíaco. La decocción de hojas ha servido como terapia antiemética en el embarazo. A pesar de las diferentes culturas y tradiciones que hay en los países de América del Sur y Centroamérica, varios de los usos que se le da a *Bixa orellana* son los mismos, entre ellos se destaca los siguientes: antipiréticos, afrodisíacos, antidiarreicos, antidiabéticos y repelentes de insectos (Vilar et al., 2014).

1.2.3. Composición Química.

Actualmente, han sido aislados más de 24 compuestos de las semillas de *Bixa orellana*. Así mismo a más de la bixina y la norbixina, se han aislado otros compuestos como isobixina, betacaroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, orelina, bixol, crocetina, ishwarano, ácido elágico, ácido salicílico, treonina, ácido tomentosico, triptófano y fenilalanina en las semillas del achiote (Vilar et al., 2014). Varias investigaciones afirman que en las semillas *B. orellana* se han encontrado compuestos como los tocotrienoles (Barrie Tan & Sunderland, 2003).

1.2.3.1. Bixina.

La bixina, un carotenoide de color rojo, es el pigmento con mayor concentración en el arilo de las semillas del achiote. Es la sustancia principal responsable de las características de teñido de las semillas, donde su concentración puede ser tan alta como 5,0%. Sin embargo, las diferentes semillas pueden tener niveles inferiores al 2,0%, y debido a que su valor comercial se basa en el porcentaje de bixina, normalmente se requieren niveles superiores al 2,5% para la exportación. La bixina fue aislada por primera vez a partir de las semillas de *Bixa orellana* en 1875 y, en 1961 su estructura química completa y estereoquímica se determinaron por RMN ^1H y ^{13}C . La bixina pertenece a la pequeña clase de apocarotenoides naturales, cuya formación se produce por la degradación oxidativa de los carotenoides C40 (Franco et al., 2008).

1.2.3.2. Vitamina E y Tocotrienoles.

La vitamina E está compuesta por ocho vitámeros: cuatro son tocoferoles (α , β , γ , δ), que poseen una cola de hidrocarburo saturada, y cuatro son tocotrienoles (α , β , γ , δ), que poseen tres dobles enlaces trans en la cola del hidrocarburo. Según investigaciones se ha determinado que los

tocoles tienen efectos benéficos para la salud cuando se proporcionan como suplemento dietético. Recientemente se ha demostrado que los tocotrienoles tienen efectos beneficiosos para la salud no observados con los tocoferoles. Los tocotrienoles comercialmente disponibles se purifican a partir de aceites naturales, donde se presentan como mezclas complejas de tocotrienoles y tocoferoles. Es muy difícil separar los tocotrienoles puros de estas mezclas y por lo tanto estos compuestos son muy caros. También es difícil obtener los tocotrienoles en concentraciones suficientemente altas para ser usadas en algunas aplicaciones (Compadre et al., 2015).

Los tocotrienoles son clasificados como cromanoles farnesilados (FC) y terpenoides mixtos. Varias investigaciones afirman que los tocotrienoles, poseen efectos hipocolesterolémicos, así como también una capacidad de reducir los niveles en plasma de lipoproteína y apolipoproteína aterogénica B. También se considera que los tocotrienoles son útiles para el tratamiento de enfermedad cardiovascular y cáncer (Barrie Tan, 2014).

1.2.3.2.1. Delta Tocotrienol (DT3).

Se ha demostrado que DT3 (figura 2) tiene; tanto eficacia radioprotectora (administrada antes de la exposición a la radiación) como radiomitigadora (administrada después de la exposición a la radiación). Recientemente, se demostró que este compuesto reduce la activación de caspasa-8, caspasa-3 y caspasa-7 mientras que aumenta la expresión de beclin-1 relacionada con la autofagia en células de la médula espinal irradiadas (Satyanitra et al., 2011). También se ha informado que incrementa la supervivencia celular y la regeneración de microorganismos hematopoyéticos y células madre y progenitoras de linaje / Sca-1 + / c-Kit + en células de médula ósea de ratón irradiadas (Singh et al., 2014).

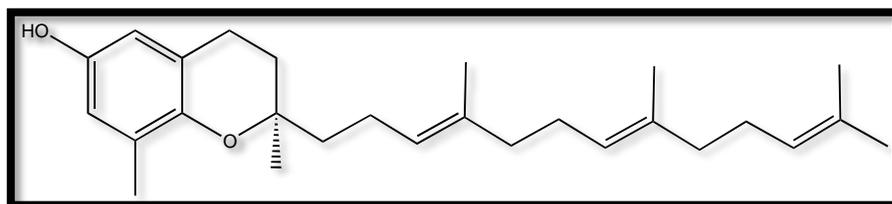


Figura 2. Estructura de delta tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

1.2.3.2.2. *Gamma Tocotrienol (GT3).*

Según investigaciones GT3 (figura 3) actúa como mejor radioprotector que el alfa tocoferol en ratones, inclusive a dosis de radiación supra-letal. Además, GT3 es un potente inhibidor de la hidroximetil glutaril CoA reductasa (Singh et al., 2014), una enzima fundamental en la síntesis del ácido mevalónico, un intermediario metabólico clave en la biosíntesis del colesterol (Wright, Pearce, Parker & Quereshi, 2015).

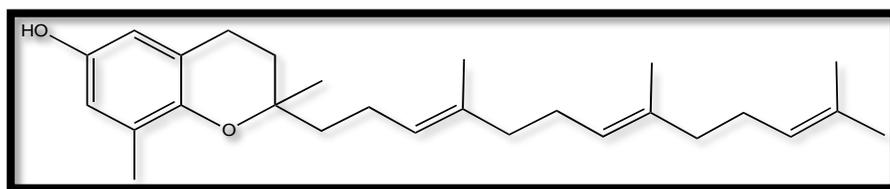


Figura 3. Estructura de gamma tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

1.2.4. Actividad Biológica.

Se han investigado diferentes propiedades farmacológicas para los extractos de achiote (semilla), entre los cuales se destaca (Vilar et al., 2014): hipoglucemiante (Russell, Omoruyi, Pascoe & Morrison, 2008), antioxidante (Kiokias & Gordon, 2003), anticancerígeno (Reddy, Alexander-Lindo, & Nair, 2005), radioprotector (Karchuli & Ganesh, 2009), antimicrobiano (Rojas, Ochoa, Ocampo & Muñoz, 2006), repelente de mosquitos y antipalúdico (Giorgi et al., 2013).

1.3. Extracción de materias primas vegetales

Previo al inicio de un proceso extractivo es importante que se defina la selectividad del solvente que se va a usar en el proceso. Según los fines que se requieran se puede obtener dos tipos de extractos, el primero puede ser un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los compuestos químicos de la planta, en este caso se usa solventes con naturaleza general (alta polaridad) por ejemplo; el metanol. Otro tipo de extracto es el que contiene únicamente compuestos químicos con una determinada característica, en este caso se utiliza un solvente selectivo, de menor polaridad, por ejemplo el hexano; que sólo extraerá las grasas vegetales de la planta y otros constituyentes apolares (Sharapin, 2000).

La extracción consiste en que la planta seca se pone en contacto con el solvente, lo que ocasiona el inicio de un proceso que desarrolla la reconstitución del estado original de la célula. Primeramente el solvente penetra en la célula vegetal y expelle el aire del citoplasma, de esta

manera se da el inicio al proceso extractivo, dicha penetración conlleva un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que serán extraídos, de esta manera las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente (Sharapin, 2000).

1.3.1. Molienda o trituración.

Consiste en disminuir el tamaño de las partículas de la droga vegetal de tal forma que sea adecuada para la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de compuestos de una planta entera o reducida a fragmentos gruesos no sería completa, ya que el solvente realiza una penetración muy pobre al tejido vegetal, a su vez sería lenta; a tal punto que al momento en que las membranas celulares actúen como barrera dificultarán el proceso de extracción. Si se tritura la planta de forma correcta la disolución de los compuestos celulares será en el líquido externo, ya que las membranas se encontrarán parcialmente destruidas (Sharapin, 2000).

1.3.2. Maceración.

La maceración consiste en poner en contacto la planta y el solvente, por algunos días, tiempo que se establecerá en función del solvente y equipo seleccionado. Es un proceso que es resultado del equilibrio de concentración de la planta (droga) y el solvente, depende de diversos factores; que se relacionan con la planta (naturaleza, tamaño de partícula, humedad) y con el solvente (selectividad, cantidad). En el proceso típico de maceración se deja que la planta esté en contacto con el solvente durante varios días, con agitación ocasional; llamado maceración simple o estática, mientras que con movimiento constante se denomina maceración dinámica. Ambos tipos de maceración pueden realizarse en temperatura ambiente o elevada (Sharapin, 2000).

1.4. Validación de métodos analíticos

1.4.1. Fin.

La validación es un proceso definido para conseguir pruebas evidenciadas y demostrativas de que un método analítico es lo adecuadamente verídico y reproducible, con la finalidad de producir un resultado previsto dentro de intervalos definidos; se basa en la determinación de varios parámetros, que se aplicarán de acuerdo a la categoría que pertenezcan (Burneo, 2012).

1.4.2. Parámetros.

Para verificar que un método es apropiado para la aplicación que se proyecta, es correcto determinar a través de estudios de laboratorio sus parámetros. Para determinar cuantitativamente a uno o varios componentes los parámetros a precisar son:

1.4.2.1. Especificidad.

En la mayoría de los métodos analíticos es fundamental asegurar que la señal producida en la etapa de medición es solamente del analito de interés y no a la presencia de sustancias que interfieran en la cuantificación de este. Por lo tanto, es necesario probar la especificidad (o selectividad) del método analítico (Boqué, Maroto, Riu, & Rius, 2002).

1.4.2.2. Linealidad.

En todos los métodos cuantitativos es necesario determinar el intervalo de concentraciones de analito o los valores de propiedades para los que se puede aplicar el método analítico (Boqué et al., 2002). La linealidad es la capacidad de un método analítico, dentro de un determinado intervalo, de dar un resultado instrumental que sea proporcional a la cantidad de analito que se va a establecer en la muestra que se use en el laboratorio (Sandoval, 2010). Es recomendable elaborar una curva de calibración con mínimo cinco concentraciones diferentes. Comúnmente se usa el coeficiente de correlación (r^2) de 0,99 como criterio de la linealidad (Burneo, 2012).

1.4.2.3. Límite de cuantificación (LOQ).

Es una característica de rendimiento que determina la capacidad de un proceso de medición química para cuantificar de manera correcta un analito y es definida como la cantidad o concentración más baja que se puede determinar de analito, con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Estas estimaciones se producirán con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 10 % (o 6 %) (Boqué et al., 2002).

1.4.2.4. Límite de detección (LOD).

Es la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede detectarse de forma fiable por un método dado (Boqué et al., 2002). Otra definición más reciente es: concentración o cantidad real del analito presente en la muestra de análisis que conducirá, con una probabilidad, a la conclusión de que la concentración (cantidad) del analito es mayor en el material que se analiza que en el material testigo (Sandoval, 2010).

1.4.2.5. Exactitud.

La Guía Técnica de Validación de Métodos define la exactitud como: “el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia”. El término “exactitud”, está aplicado a un grupo de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo (Sandoval, 2010). En otras palabras la exactitud expresa la cercanía que hay entre el valor que es aceptado, y el valor encontrado obtenido al aplicar un determinado número de veces el procedimiento establecido (Burneo, 2012).

1.4.2.6. Precisión.

La precisión de un método analítico describe la cercanía de las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a alícuotas múltiples de un único volumen homogéneo de matriz biológica (FDA, 2001), se expresa como el porcentaje de la desviación estándar relativa de un número de muestras que deben ser estadísticamente significativas, depende de la concentración y debe medirse con concentraciones diferentes dentro del rango aceptado. Una precisión admisible es del 20% (Burneo, 2012).

1.4.2.7. Repetibilidad.

Se define como la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, lo que significa; que son condiciones en donde los resultados de análisis independientes se consiguen con el mismo método en ítems de análisis similares, en el mismo laboratorio y por el mismo técnico, a través del uso del mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo (Sandoval, 2010).

1.4.2.8. Reproducibilidad.

Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, en otras palabras, son condiciones donde los resultados de los análisis se logran con el mismo método en ítems semejantes de análisis en condiciones diferentes como de laboratorio, otros operadores, equipos distintos, etc. (Sandoval, 2010).

1.4.2.9. Recuperación.

Es la concentración medida respecto a la cantidad conocida añadida a la matriz. Los experimentos de recuperación deben realizarse para muestras extraídas a tres concentraciones. La recuperación permite observar el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. De esta manera, la

recuperación está interiormente relacionada a las características de la matriz de la muestra (FDA, 2001).

1.5. Derivatización

La derivatización es una técnica utilizada en química (analítica, general), en la que un compuesto químico se transforma por reaccionar con un producto similar, llamado derivado (Pineda, 2015).

La derivatización en GC-MS puede definirse como una técnica que modifica principalmente la funcionalidad de un analito para permitir separaciones cromatográficas. Un analito modificado en este caso será el producto, que se conoce como el derivado. El derivado puede tener una estructura similar o estrechamente relacionada al compuesto químico original (Orata, 2012).

1.5.1. Sililación vía N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA).

La sililación es la reacción más frecuente utilizada en la derivatización, ya que hace menos polar la muestra, permitiendo una mejor volatilización. Se introduce un grupo sililo en las moléculas mediante una reacción S_N2 con el hidrógeno activo. La reacción es impulsada por la presencia de un buen grupo saliente, con baja basicidad, y su capacidad para estabilizar una carga negativa en el estado de transición. También por el enlace posterior entre el grupo saliente y el átomo de silicio. El mecanismo implica la sustitución del hidrógeno activo por el grupo trimetil-sililo. En este tipo de derivatización, tanto los disolventes como las muestras deben estar completamente secos debido a la sensibilidad del reactivo silílico a la humedad (Pineda, 2015).

1.6. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía definida como técnica de análisis instrumental tiene la capacidad de brindar información tanto cualitativa como cuantitativa sobre la composición de una mezcla. También, las especies separadas se pueden determinar empleando los detectores apropiados (Valencia, 2008).

La cromatografía de gases es una técnica, cuyo método consiste en la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos, son varias de sus ventajas. Usualmente la cromatografía de gases es empleada para determinar la presencia o ausencia de uno o varios compuestos en una muestra determinada. Por otro lado, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi infalible cualquier sustancia pura, pero regularmente no tiene la capacidad de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, esto se

debe a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. En conclusión, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases (figura 4) se va a separar en la columna cromatográfica consiguiendo la elución continua de los componentes individuales aislados que van rápidamente al espectrómetro de masas, aquí cada compuesto se rastrea en forma de pico cromatográfico y se identifica a través de su correspondiente espectro de masas (Gutiérrez & Droguet, 2002). La cromatografía de gases es ampliamente usada para realizar análisis cuantitativos y cualitativos de mezclas, para la purificación de compuestos y para la determinación de constantes termoquímicas como por ejemplo calores de solución y vaporización, coeficientes de actividad y presión de vapor (Gutiérrez & Droguet, 2002).

1.6.1. Tipos de detectores.

Los detectores cromatográficos son dispositivos que miden la concentración de cada componente de la muestra y generan una señal eléctrica proporcional a dicha concentración (Valencia, 2008)

1.6.1.1. Detector de Ionización de Llama (DIL).

Es el detector más usado, y uno de los más aplicables en cromatografía de gases. El fundamento del DIL menciona que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del gas. Su respuesta se da al número de átomos de carbono que entran en el detector por unidad de tiempo, es por esto que es considerado un detector sensible a la masa que un sistema sensible a la concentración (Valencia, 2008).

1.6.1.2. Detector de Conductividad Térmica (DCT).

Su funcionamiento se basa en el principio de que; un cuerpo caliente perderá calor a una velocidad que depende de la composición del gas que lo rodea. De esta forma la velocidad de pérdida de calor podría usarse como una medida de la composición del gas (Valencia, 2008).

1.6.1.3. Detector de Captura de Electrones (DCE).

Este detector es uno de los más usados para analizar muestras medioambientales, debido a la gran selectividad para detectar compuestos halogenados, como pesticidas, etc. Este tipo de detector mide las disminuciones de una señal en vez del aumento de la corriente eléctrica. Una lámina de tritio ioniza las moléculas de nitrógeno y forma electrones lentos, eso sucede a medida de que el gas nitrógeno fluye por el detector (Valencia, 2008).



Figura 4. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tratamiento de las muestras de *Bixa orellana*

2.1.1. Recolección, secado y trituración de 120 muestras de *Bixa orellana*.

Los especímenes de *B. orellana* utilizados en la presente investigación fueron colectados por un grupo de técnicos de la Universidad en 4 sectores de la zona sur del Ecuador; 3 de la provincia de Zamora Chinchipe los cuales fueron: Jamboé, Los Encuentros y Podocarpus y 1 de la provincia de Loja, el cual fue Paltas, de cada sector se recolectaron 30 muestras (frutos) las cuales inmediatamente fueron puestas en la cámara de secado durante 3 días a 35 °C y 40% de humedad.

Seguidamente se procedió a desgranar frutos de *B. orellana* para obtener las semillas, por último se trituró de entre 30 a 40 semillas por cada espécimen a través de un molino eléctrico hasta un tamaño de partícula menor a 75. Se dividieron las semillas trituradas en 3 porciones de 100 mg cada una y se pusieron en viales ámbar, con la finalidad de realizar los análisis por triplicado para cada una de éstas.

2.1.2. Extractos de *B. orellana* a través de maceración dinámica.

A cada porción de 100mg se le realizó maceración dinámica, dicho proceso consistió en agregar 10 mL de hexano a los viales que contenían la muestra, para seguidamente llevarlos a un agitador orbital por un periodo de 4 horas a 250 rpm. Una vez finalizada la agitación se filtró el macerado usando papel filtro en frascos ámbar los cuales previamente fueron etiquetados bajo el código BO-121 – BO-240, para cada repetición se usaron las letras A-B-C, es decir BO-121A, BO-121B, BO-121C. Cabe destacar que los procesos de maceración y filtrado se realizaron por duplicado para cada muestra.

Una vez finalizado el proceso de maceración dinámica se procedió a secar los extractos en la cabina de flujo laminar y posteriormente se almacenaron las muestras en un refrigerador General Electric FUF 14SVJRWW a 4°C, obteniendo así los extractos de *B. orellana*.

2.1.3. Preparación de las muestras a partir de los extractos.

Cada extracto almacenado se llevó a temperatura ambiente y se disolvió en un balón de aforo ámbar de 10 mL en etanol grado reactivo con la ayuda del ultrasonido para su disolución. De esta disolución se tomaron 50 uL en un insert y se agregaron 12,5 uL de α -tocoferol como estándar interno. La mezcla se ubicó en una cámara de vacío para que se evapore el solvente. Finalmente se agregaron 50 uL de derivatizante MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide), se selló

el vial de cada muestra, dejando reposar durante 15 minutos para que se produzca la reacción y a continuación se realizó la inyección de cada muestra en el GC-MS.

2.2. Validación del método analítico

La validación del método analítico se realizó con la finalidad de certificar que los resultados obtenidos a través de los análisis realizados son veraces. Para la validación se usaron estándares certificados de delta y gamma tocotrienol; alfa tocoferol con pureza > 99,6% provistos por la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas de Little Rock, Estados Unidos. A continuación, se describe como se realizó la preparación de los estándares.

2.2.1. Preparación de soluciones: madre, estándar interno, muestra.

2.2.1.1. Preparación de delta tocotrienol.

Para preparar esta solución madre se pesaron 7,71 mg de δ -tocotrienol y se aforó con etanol grado reactivo en un balón de 10 mL, por ende se obtuvo una concentración de 771 ng/uL.

2.2.1.2. Preparación de gamma tocotrienol.

Para preparar esta solución madre se pesaron 4,17 mg de γ -tocotrienol y se aforó con etanol grado reactivo en un balón de 10 mL, por ende se obtuvo una concentración de 417 ng/uL.

2.2.1.3. Preparación de alfa tocoferol.

Para preparar el estándar interno se pesaron 9,61 mg de α -tocoferol y se aforó con etanol grado reactivo en un balón de 10 mL, por ende se obtuvo una concentración de 961 ng/uL.

2.2.1.4. Preparación de muestra.

Para la preparación de la muestra se pesaron 3 mg de extracto de *Bixa orellana* (extracto previamente preparado por un técnico de la UTPL) y se aforó con etanol grado reactivo en un balón de 10 mL, por ende se obtuvo una concentración de 300 ng/uL.

2.2.2. Método Analítico.

Los procedimientos para determinar los diferentes parámetros del método se describirán a continuación.

2.2.2.1. Linealidad.

Se realizó una curva de calibración la cual fue construida en tres días consecutivos a partir de la concentración inicial de 771 ng/uL para δ -tocotrienol y de 417 ng/uL para γ -tocotrienol; se determinaron 5 puntos a partir de diferentes concentraciones; las cuales fueron de 3; 7,5; 18,75; 46,88 y 117,19 ng/muL para δ -tocotrienol y 0,55; 1,375; 3,438; 8,594 y 21,484 ng/uL para γ -tocotrienol.

2.2.2.1.1. Linealidad (preparación de muestras para la curva).

A partir de las soluciones madres de δ y γ tocotrienol se preparó una alícuota madre, la cual se hizo a partir de una concentración de 117,9 ng/uL para δ -tocotrienol y 21,484 ng/uL para γ -tocotrienol, al realizar los cálculos se tomó 228 uL y 77,3 uL de delta y gamma tocotrienol, respectivamente y se aforó a 1500 uL con etanol grado reactivo; a partir de esta alícuota madre se preparó 4 alícuotas diferentes tomando volúmenes de 600, 240, 96 y 38,4 uL en base a las concentraciones respectivas de cada compuesto y se aforó a 1500 uL con etanol grado reactivo. A cada vial se lo colocó en el vórtex durante 10 segundos para homogenizar la muestra. Ver **Anexo II**.

2.2.2.2. Preparación de alícuota del Estándar Interno (EI).

Para el método analítico planteado se determinó una concentración de 15 ng/uL para el EI; se tomó un volumen de 23,41 uL del alfa tocoferol madre y se aforó en un vial de 1500 uL con etanol grado reactivo. Ver **Anexo II**.

2.2.2.3. Preparación de muestras para la lectura en el Cromatógrafo de gases.

De cada concentración preparada se tomaron 100 uL y se agregó en un vial con insert de 1,5 mL por cuadruplicado, a cada vial se agregó 25 uL de la alícuota de EI previamente preparado y se colocaron los viales en la cámara de vacío para secarlos en un periodo de 30 a 60 min. Se agregó el derivatizante y se esperó de 15 a 20 minutos para que reaccione.

La cuantificación se la realizó en el cromatógrafo de gases acoplado a masas con el método VALIDACION_GAMA_Delta.

El cromatógrafo de gases es un equipo Agilent Technologies 6890N acoplado a espectrometría de masas (Agilent Technologies 5973 inert), la separación se alcanzó utilizando un tipo de columna DB-5ms: 0.25 mm x 30 m y 0.25 μ m de espesor de la película, bajo las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones de trabajo del equipo de GC-MS.

Temperatura inicial	220 °C
Tiempo inicial	2 minutos
Rampa	25
Temperatura final	300 °C
Tiempo de equilibrio	1 minuto
Tiempo de corrido	15.20 minutos
Fase móvil	Helio
Presión	118.4 KPa
Flujo de gas	30mL/minuto
Modo	SIM (468,482 y 502)

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

2.2.2.4. Límites.

Para determinar los límites de detección y cuantificación se utilizó los resultados de las concentraciones más bajas para cada compuesto es decir 3 ng/uL y 0,55 ng/uL (δ y γ tocotrienol), usando la media y desviación estándar del conjunto de resultados de dichas concentraciones.

2.2.2.4.1. Límites de cuantificación.

Para determinar el LOQ se usó la ecuación:

$$\text{LOQ} = m + 5D.E.$$

Donde:

m: media

D.E: desviación estándar de los resultados analizados de las muestras con menor concentración.

2.2.2.4.2. Límites de detección.

Para determinar el LOD se usó la ecuación:

$$\text{LOD} = m + 3D.E.$$

Donde:

m: media

D.E: desviación estándar de los resultados analizados de las muestras con menor concentración.

2.2.2.5 Exactitud

La exactitud se determinó a través de la recuperación; se tomó las tres concentraciones más bajas preparadas anteriormente, es decir 3; 7,5; 18,75 ng/uL para δ -tocotrienol y 0,55; 1,375; 3,438 ng/uL para γ -tocotrienol. Se agregó 100 uL de cada una y se insertó en tres viales distintos

con insert, se agregó 25 uL de estándar interno y se puso a secar de entre 30 a 60 minutos, una vez seco, se colocó 100 uL de muestra (extracto de *Bixa orellana*) con una concentración de 300 ng/uL y dejamos secar. Seguidamente se colocó 50 uL de derivatizante, se esperó de entre 15 a 20 minutos para que reaccione, finalmente se procedió a leer en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas. El análisis se lo realizó por triplicado para cada concentración.

2.2.2.6. Precisión.

La precisión se determinó a través de la repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad: la determinación de este parámetro fue realizado por un operario, bajo las mismas condiciones y metodologías de la exactitud en intervalos cortos de tiempo. Se utilizaron 3 concentraciones para cada compuesto (3; 7,55 y 46,88 ng/uL δ -tocotrienol); (1,375; 8,594 y 21,484 ng/uL γ -tocotrienol).

Reproducibilidad: la determinación de este parámetro fue realizada por 3 operarios bajo las mismas condiciones y metodologías de la exactitud de manera individual en 3 días distintos. Se utilizaron 3 concentraciones para cada compuesto (3; 7,55 y 46,88 ng/uL δ -tocotrienol); (1,375; 8,594 y 21,484 ng/uL γ -tocotrienol). Operario 1: Ing. James Calva, operario 2: Pablo Condolo, operario 3: M. Sc. Santiago Ojeda.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extractos de *B. orellana*

Se obtuvieron 360 extractos de *B. orellana*, a través de maceración dinámica. La elección del hexano como solvente para la extracción fue debido a que se necesitaba obtener extractos que presenten compuestos químicos con una determinada característica, estos compuestos fueron los tocotrienoles, para su extracción se necesitó un solvente apolar. El tiempo de extracción se determinó en función del solvente y del agitador usado.

Para disminuir las pérdidas del extracto en el residuo de la extracción, la operación de maceración puede repetirse 2 o 3 veces después de haber escurrido el solvente de la extracción anterior. Este procedimiento disminuye la cantidad de extracto retenido en el residuo (Sharapin, 2000).

Dados éstos aspectos, nuestros extractos de *Bixa orellana*, estuvieron en buenas condiciones para determinar la concentración de δ -tocotrienol y γ -tocotrienol.

Las tablas 3 y 4 detallan el rendimiento de los extractos que presentaron la mayor concentración de tocotrienoles; mientras que las tablas 5 y 6 detallan el rendimiento de los extractos que presentan menor concentración de tocotrienoles. Dicho rendimiento se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$Rendimiento = \frac{\text{mg de extracto obtenido}}{\text{mg de materia seca}} * 100$$

En la Tabla 3, se observa las muestras que presentan mayor concentración de δ -tocotrienol por sector, también se indica el rendimiento del extracto de cada una de estas muestras; aquí se puede evidenciar que el extracto con mayor rendimiento de δ -tocotrienol es el de la muestra BO-209, sin embargo esta muestra no posee la mayor concentración para este compuesto; la muestra con mayor concentración de δ -tocotrienol es la BO-121, pero el rendimiento de su extracto es el menor entre las 4 muestras.

Tabla 3. Rendimiento porcentual de extractos con mayor concentración de δ -tocotrienol.

Muestra	Concentración δ -tocotrienol	mg extracto de obtenido	mg de materia seca	Rendimiento del extracto
BO-121	90,9491 ng/uL	8,87	101,05	8,77%
BO-160	89,8672 ng/uL	11,3	102,33	11,04%
BO-209	68,0299 ng/uL	15,3	101,67	14,46%
BO-231	81,4549 ng/uL	10,73	101	10,63%

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

En la Tabla 4, se observa las muestras que presentan mayor concentración de γ -tocotrienol por sector, también se indica el rendimiento del extracto de cada una de estas muestras; aquí se puede evidenciar que el extracto con mayor rendimiento de γ -tocotrienol es el de la muestra BO-163, sin embargo esta muestra no posee la mayor concentración para este compuesto.

Tabla 4. Rendimiento porcentual de extractos con mayor concentración de γ -tocotrienol.

Muestra	Concentración γ -tocotrienol	mg extracto de obtenido	mg de materia seca	Rendimiento del extracto
BO-121	12,2221 ng/uL	8,87	101,05	8,77%
BO-163	18,3274 ng/uL	22	101,33	21,71%
BO-205	14,1614 ng/uL	9,93	100,67	9,87%
BO-231	18,9781 ng/uL	10,73	101	10,63%

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

En ambos casos (δ y γ tocotrienol) se evidencia una notoria variación entre las concentraciones obtenidas y el rendimiento de los extractos; por lo tanto los valores establecidos reflejan el porcentaje del extracto, más no el de las concentraciones de tocotrienoles obtenidas.

En la Tabla 5 y 6, se detallan los rendimientos porcentuales de los extractos de las muestras con la menor concentración por sector δ y γ -tocotrienol.

Tabla 5. Rendimiento porcentual de extractos con menor concentración de δ -tocotrienol.

Muestra	Concentración δ -tocotrienol	mg extracto de obtenido	mg de materia seca	Rendimiento del extracto
BO-149	10,3678 ng/uL	4,47	101	4,42%
BO-180	33,4932 ng/uL	6,80	100,93	6,74%
BO-206	13,4418 ng/uL	5,87	101	5,81%
BO-224	21,1944 ng/uL	5,37	101	5,31%

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 6. Rendimiento porcentual de extractos con menor concentración de γ -tocotrienol.

Muestra	Concentración γ -tocotrienol	mg extracto de obtenido	mg de materia seca	Rendimiento del extracto
BO-149	0,3232 ng/uL	4,47	101	4,42%
BO-180	2,2240 ng/uL	6,80	100,93	6,74%
BO-206	0,7605 ng/uL	5,87	101	5,81%
BO-212	4,0056 ng/uL	6,60	101	6,53%

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

3.2. Validación del Método Analítico

3.2.1. Linealidad.

Según la Guía de Validación de la Salud Pública de Chile: “el fin de determinar la linealidad es el de verificar si el método es capaz de dar una respuesta en un determinado intervalo de concentraciones, proporcional a la cantidad de analito que se determinará en el laboratorio” (Sandoval, 2010).

Los criterios de aceptación planteados para la linealidad del método en ambos compuestos fueron tomados de la guía de validación; así tenemos:

- El coeficiente de correlación (r^2) debe ser mayor a 0.99.
- Pendiente distinta de cero.
- Intercepto distinto de cero.

Para determinar los resultados de linealidad se usó el programa Excel 2010, a través de regresión lineal; cuyos resultados fueron:

3.2.1.1. δ -tocotrienol.

La curva de calibración del δ -tocotrienol fue evaluada utilizando muestras estándar sobre cinco concentraciones (3; 7,5; 18,75; 46,88 y 117,19 ng/uL) como se muestra en la Figura 5. Los resultados de linealidad se determinaron a través de regresión lineal, cuyos datos se obtuvieron graficando el rango del área del pico del δ -tocotrienol contra el estándar interno (y) versus la concentración del analito (ng/uL) en la muestra (Ver Anexo III). La curva de calibración fue construida en el rango de 3–117,19 ng/uL, con los datos que se muestran en la tabla 7. El promedio de las ecuaciones de regresión de estas curvas y sus coeficientes de correlación (r^2) fue el siguiente:

- $r^2 = 0,9992$
- Pendiente: $y = 0,1604$
- Intercepto: $- 0,02$

Tabla 7. Valores de δ -tocotrienol para la curva de calibración.

X	Y	Y_min	Y_max
3	0,4340	-0,8303	1,7139
7,5	1,0577	-0,2570	2,5095
18,75	2,8882	1,1762	4,4985
46,88	7,8748	4,7599	9,4719
117,19	18,6464	13,7172	21,9028

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

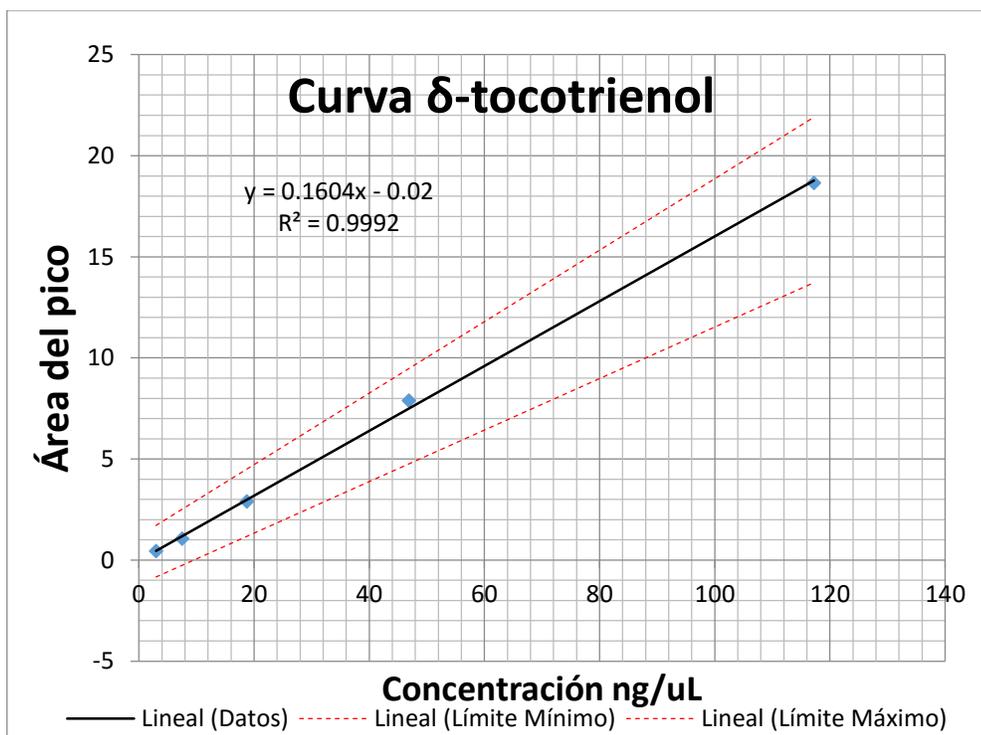


Figura 5. Linealidad de δ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

3.2.1.2. γ -tocotrienol.

La curva de calibración de γ -tocotrienol fue evaluada utilizando muestras estándar sobre cinco concentraciones (0,55; 1,375; 3,438; 8,594 y 21,484 ng/uL) Figura 6. Los resultados de linealidad se determinaron a través de regresión lineal, cuyos datos se obtuvieron graficando el rango del área del pico del γ -tocotrienol contra el estándar interno (y) versus la concentración del analito (ng/uL) en la muestra (Ver Anexo III). La curva de calibración fue construida en el rango de 0,55–21,484 ng/uL, con los datos que se muestran en la tabla 8. El promedio de las ecuaciones de regresión de éstas curvas y sus coeficientes de correlación (r^2) fue el siguiente:

- $r^2 = 0,9996$
- Pendiente: $y = 0,1339$
- Intercepto: $0,0673$

Tabla 8. Valores de γ -tocotrienol para la curva de calibración.

X	Y	Y_min	Y_max
0,5500	0,1065	-0,0551	0,4034
1,3750	0,2529	0,0289	0,5332
3,4375	0,5515	0,2391	0,8578
8,5938	1,2372	0,7646	1,6692
21,4844	2,9321	2,0782	3,6977

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

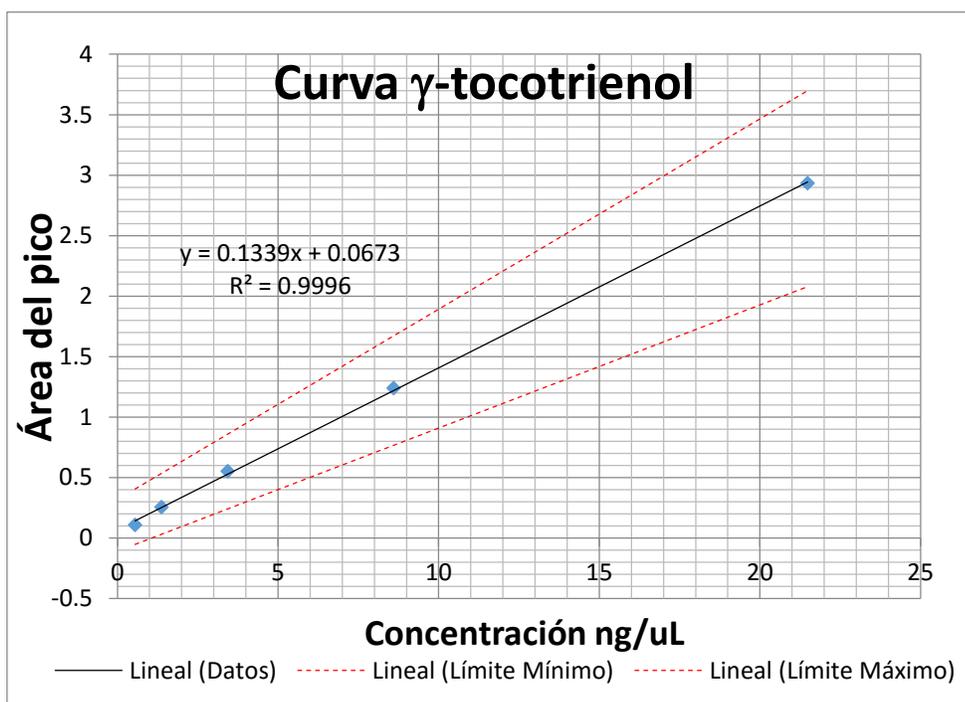


Figura 6. Linealidad de γ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

En las Tablas 7 y 8, también se indica los puntos mínimos y máximos determinados, los cuales se calcularon a partir de los datos que se muestran en el Anexo IV, dichos puntos reflejan el rango en el que cada curva del método en teoría debe encontrarse.

Según la guía de directrices para la validación de métodos analíticos de la ONU, el r^2 que es igual o mayor a 0,99; significa que hay una relación directamente proporcional entre el intervalo de

concentraciones comprendido con la respuesta (Anderson, 2010); es decir el método presenta una buena linealidad tanto para δ -tocotrienol en el rango de concentraciones de 3–117,19 ng/uL, como para γ -tocotrienol en el rango de 0,55–21,484 ng/uL.

3.2.2. Límites detección (LOD) y Límites de cuantificación (LOQ).

Los límites de detección y cuantificación fueron determinados a través de la fórmula propuesta en metodología; a partir de los resultados obtenidos por triplicado de la menor concentración es decir; 3 ng/uL y 0,55 ng/uL para δ -tocotrienol y γ -tocotrienol, respectivamente.

3.2.2.1. δ -tocotrienol.

En la Tabla 9, se muestra el conjunto de resultados de la menor concentración (3 ng/uL) que obtuvo cada operario; el promedio y desviación estándar de los mismos.

Tabla 9. Valores de la concentración más baja para determinar LOD y LOQ de δ -tocotrienol.

	Operario 1	Operario 2	Operario 3	Promedio	Desv. Est
3 ng/uL	1,7615	3,6282	4,1339	2,4954	1,1213
	3,8568	3,9309	0,5850		
	1,8556	2,9099	1,3959		
	1,4927	2,0468	2,3480		

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Cálculo del límite de detección

Media (Promedio): 2,4954

Desviación Estándar: 1,1213

LOD= $m+3D.S.$

LOD= $2,4954 + 3 * 1,1213$

LOD= 5,86 ng/uL

Cálculo del límite de cuantificación

Media (Promedio): 2,4954

Desviación Estándar: 1,1213

LOD= $m+5D.S.$

LOD= $2,4954 + 5 * 1,1213$

LOD= 8,10 ng/uL

3.2.2.2 γ -tocotrienol

En la Tabla 10, se muestra el conjunto de resultados de la menor concentración (0,55 ng/uL) que obtuvo cada operario; el promedio y desviación estándar de los mismos.

Tabla 10. Valores de la concentración más baja para determinar LOD y LOQ de γ -tocotrienol.

	Operario 1	Operario 2	Operario 3	Promedio	Desv. Est
0.550 ng/uL	-0,0178	0,7497	0,5555	0,3558	0,2290
	0,4749	0,6499	0,4571		
	0,1670	0,0431	0,3577		
	0,2118	0,0566	1,1757		

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Cálculo del límite de detección

Media: 0,3558

Desviación Estándar: 0,2290

LOQ= $m+3D.S.$

LOD= $0,3558 + 3 * 0,2290$

LOD= 1,04 ng/uL

Cálculo del límite de cuantificación

Media: 0,3558

Desviación Estándar: 0,2290

LOQ= $m+5D.S.$

LOD= $0,3558 + 5 * 0,2290$

LOD= 1,50 ng/uL

El límite de detección, LOD, se define comúnmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada de manera fiable por un método analítico dado (Boqué et al., 2002); siendo 5,86 ng/uL y 1,04 ng/uL para δ -tocotrienol y γ -tocotrienol, respectivamente.

El límite de cuantificación LOQ, es la cantidad o concentración más baja de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (Morrillas, Barwick, Stephen, Engman & Magnusson, 2016); siendo 8,10 ng/uL y 1,50 ng/uL para δ -tocotrienol y γ -tocotrienol, respectivamente.

3.2.3. Precisión.

La precisión se define como el grado de concordancia que hay entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas (Rodríguez, Pellerano, Romero, Acevedo & Vázquez, 2012). La precisión del método se determinó a través de repetibilidad y reproducibilidad, planteando criterios de aceptación tomados de la Guía Eurachem; menor al 10% y menor al 15%, respectivamente (coeficiente de variación) (Morrillas et al., 2016). Para que el nivel de confianza de los datos sea verídico, se realizó el análisis de varianza en Excel 2010, en donde el F crítico fue mayor al F calculado, lo que significa que no existen diferencias significativas entre resultados (Ver Anexo V).

3.2.3.1. δ -tocotrienol.

En las Tablas 11 y 12, se muestran los coeficientes de variación de repetibilidad y reproducibilidad respectivamente para δ -tocotrienol; todos los valores que se observan cumplen con la condición planteada del método. En la Tabla 13, se observa que todos los F calculados son menores al F crítico, por lo que se determina que no hay diferencia significativa entre los resultados y repeticiones obtenidas.

Tabla 11. Porcentaje de Repetibilidad de δ -tocotrienol.

Concentración	% CV Repetibilidad	<10%
3 ng/uL	7,17%	Cumple condición
7,50 ng/uL	8,04 %	Cumple condición
46,88 ng/uL	9,56%	Cumple condición

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 12. Porcentaje de Reproducibilidad de δ -tocotrienol.

Concentración	% CV Reproducibilidad	<15%
3 ng/uL	7,17%	Cumple condición
7,50 ng/uL	8,04 %	Cumple condición
46,88 ng/uL	9,56%	Cumple condición

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 13. Análisis ANOVA de δ -tocotrienol.

Concentración	F calculado	F crítico	F calculado < F crítico
3 ng/uL	0,5175	4,2565	No existe diferencia significativa
7,50 ng/uL	0,8655	4,2565	No existe diferencia significativa
46,88 ng/uL	0,9504	4,2565	No existe diferencia significativa

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

3.2.3.2. γ -tocotrienol.

En las Tablas 14 y 15, se muestran los coeficientes de variación de repetibilidad y reproducibilidad respectivamente para γ -tocotrienol; todos los valores que se observan cumplen con la condición planteada del método. En la Tabla 16, se observa que todos los F calculados son menores al F crítico, por lo que se determina que no hay diferencia significativa entre los resultados y repeticiones obtenidas.

Tabla 14. Porcentaje de Repetibilidad de γ -tocotrienol.

Concentración	% CV Repetibilidad	<10%
1,375 ng/uL	10,06%	Cumple condición
8,594 ng/uL	7,03 %	Cumple condición
21,484 ng/uL	6,78 %	Cumple condición

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 15. Porcentaje de Reproducibilidad de γ -tocotrienol.

Concentración	% CV Reproducibilidad	<15%
1,375 ng/uL	10,06%	Cumple condición
8,594 ng/uL	7,03 %	Cumple condición
21,484 ng/uL	6,78 %	Cumple condición

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 16. Análisis ANOVA de γ -tocotrienol.

Concentración	F calculado	F crítico	F calculado < F crítico
1,375 ng/uL	0,9559	4,2565	No existe diferencia significativa
8,594 ng/uL	0,3951	4,2565	No existe diferencia significativa
21,484 ng/uL	1.0162	4,2565	No existe diferencia significativa

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

3.2.4. Exactitud.

La Conferencia Internacional sobre la armonización de las prescripciones técnicas para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH) sugirió un porcentaje de precisión del 80-120% para una estimación fiable de los valores reales, es decir que los resultados obtenidos en el método presentan una buena proximidad al valor real (Hui-Ling , Yee-Tan, Meganathan, Yee-Lin, 2015), . Los cálculos para determinar los porcentajes de recuperación se muestran en el Anexo VI. En las figuras 7 y 8 se puede observar que los niveles de recuperación se encuentran dentro de los límites establecidos; para ello se tomó los datos de las tablas 17 y 18 respectivamente. En dichas tablas se muestran los datos del extracto enriquecido con las 3 concentraciones mínimas para cada compuesto (3; 7,5; 18,75 ng/uL para δ -tocotrienol) y (0,55; 1,375; 3,438 ng/uL para γ -tocotrienol). Además, se comprobó que no existe tendencia en los resultados, cumpliendo con la condición para cada compuesto.

3.2.4.1. δ -tocotrienol.

Tabla 17. Porcentajes de Recuperación de δ -tocotrienol.

Extracto + 1	Extracto + 2	Extracto + 3
107%	111%	101%
115%	114%	119%
90%	100%	117%
93%	93%	105%

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

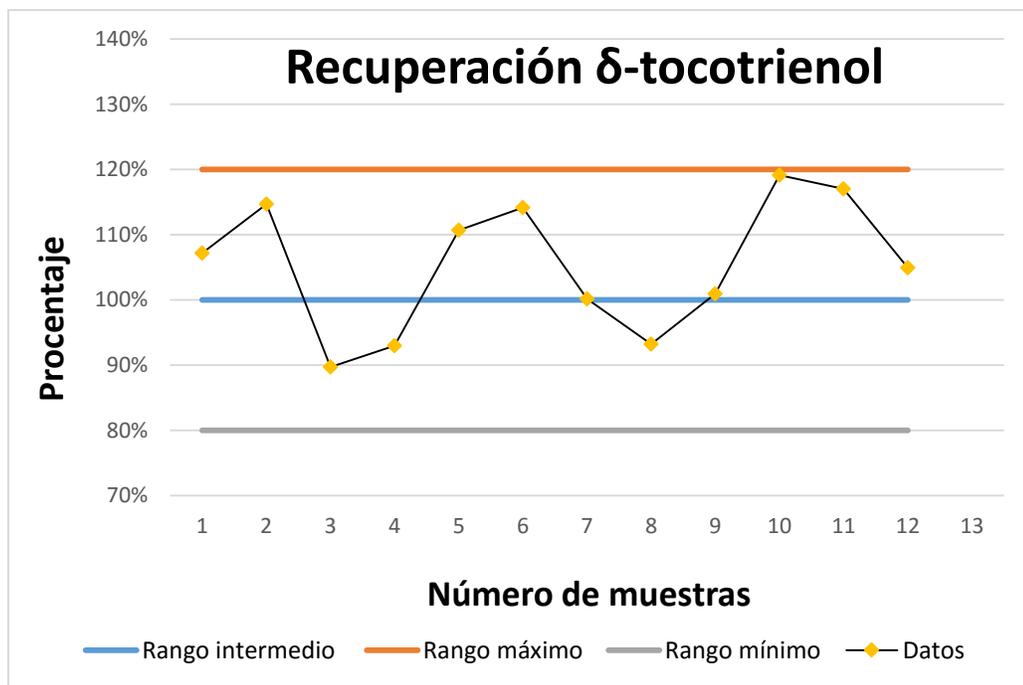


Figura 7. Recuperación de δ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

3.2.4.2. γ -tocotrienol.

Tabla 18. Porcentajes de Recuperación de γ -tocotrienol.

Extracto + 1	Extracto + 2	Extracto + 3
105%	120%	103%
92%	117%	119%
94%	104%	109%
93%	93%	97%

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

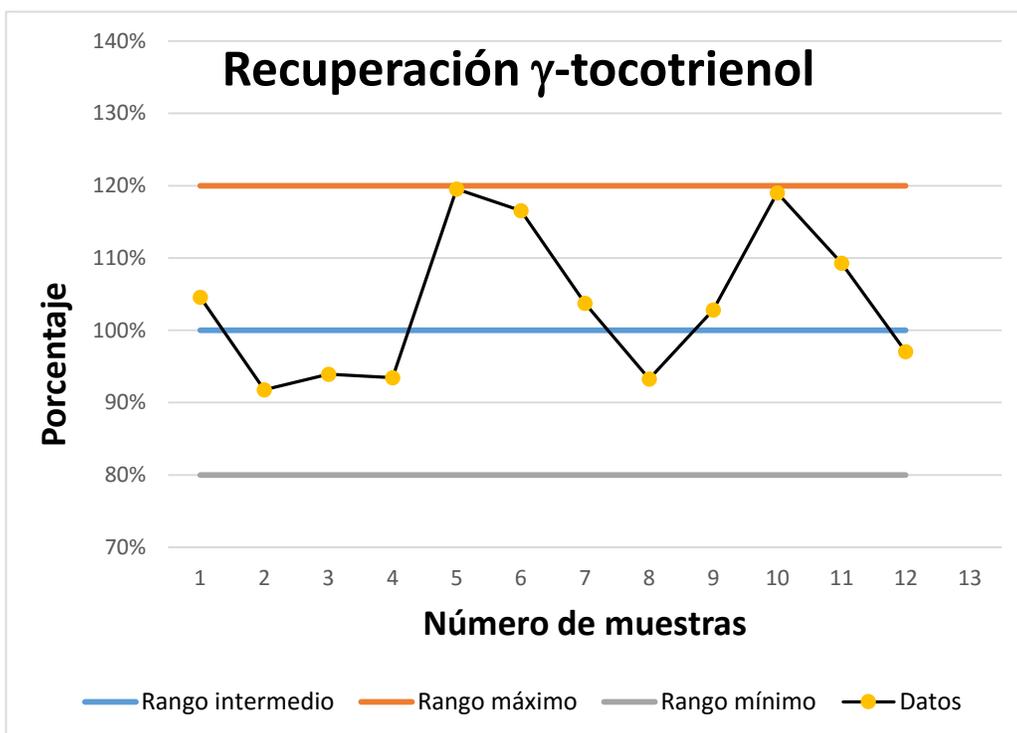


Figura 8. Recuperación de γ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

3.3. Aplicación del método analítico en los extractos de *Bixa orellana*

Una vez finalizado y validado el método analítico se procedió a realizar la cuantificación de δ y γ -tocotrienol presentes en los extractos de *Bixa orellana* a través de GC-MS, esto se evaluó utilizando las curvas de calibración del método analítico. Se determinó la concentración de un total de 120 muestras por triplicado (360 muestras). δ y γ -tocotrienol se midieron usando α -tocoferol como estándar interno a través de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

x=concentración de tocotrienol

y=relación del tocotrienol/SI

b=intercepto

m=pendiente

En el Anexo VII, se describen las tablas con las concentraciones de cada muestra por sector.

3.3.1. Resumen general de las muestras con mayor y menor concentración de δ y γ -tocotrienol.

En las tablas 19 y 20 se puede observar que el sector en el que se encuentra la muestra (BO-121) con mayor concentración de δ -tocotrienol es Jamboé (La Pituca) con 90,9491 ng/uL; mientras que en el sector de Los Encuentros está la muestra (BO-163) con mayor concentración de γ -tocotrienol con 18,3274 ng/uL, respectivamente.

Tabla 19. Muestras con mayor concentración de δ -tocotrienol por sector.

Sector General	Sector Específico	Muestra	Concentración de δ -tocotrienol
Jamboé	La Pituca	BO-121	90,9491 ng/uL
Los Encuentros	Rio Canchi	BO-160	89,8672 ng/uL
Paltas	San Francisco	BO-209	68,0299 ng/uL
Podocarpus	Piedratabla	BO-231	81,4549 ng/uL

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 20. Muestras con mayor concentración de γ -tocotrienol por sector.

Sector General	Sector Específico	Muestra	Concentración de γ -tocotrienol
Jamboé	La Pituca	BO-121	12,2221 ng/uL
Los Encuentros	Rio Canchi	BO-163	18,3274 ng/uL
Paltas	San Francisco	BO-205	14,1614 ng/uL
Podocarpus	Piedratabla	BO-231	18,9781 ng/uL

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

En las tablas 21 y 22 se puede observar que el sector Jamboé (Romerillo) es donde se presenta la muestra (BO-149) con menor concentración de δ -tocotrienol con 10,3678 ng/uL y la muestra (BO-149) con menor concentración de γ -tocotrienol con 0,3232 ng/uL, respectivamente.

Tabla 21. Muestras con menor concentración de δ -tocotrienol por sector.

Sector General	Sector Específico	Muestra	Concentración de δ -tocotrienol
Jamboé	Romerillo	BO-149	10,3678 ng/uL
Los Encuentros	Los Encuentros	BO-180	33,4932 ng/uL
Paltas	San Francisco	BO-206	13,4418 ng/uL
Podocarpus	Piedratabla	BO-224	21,1944 ng/uL

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 22. Muestras con menor concentración de γ -tocotrienol por sector.

Sector General	Sector Específico	Muestra	Concentración de γ -tocotrienol
Jamboé	Romerillo	BO-149	0,3232 ng/uL
Los Encuentros	Los Encuentros	BO-180	2,2240 ng/uL
Paltas	San Francisco	BO-206	0,7605 ng/uL
Podocarpus	Macará	BO-212	4,0056 ng/uL

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Finalmente se determinó la concentración promedio de cada compuesto por cada sector, obteniendo los siguientes resultados.

Concentración promedio por sector de δ -tocotrienol:

- Jamboé (Zamora Chinchipe): 42,9960 ng/uL.
- Los Encuentros (Zamora Chinchipe): 62, 2889 ng/uL.
- Paltas (Loja): 38,2647 ng/uL.
- Podocarpus (Zamora Chinchipe): 47,5741 ng/uL.

Concentración promedio por sector de γ -tocotrienol:

- Jamboé (Zamora Chinchipe): 4,0959 ng/uL.
- Los Encuentros (Zamora Chinchipe): 10,7732 ng/uL.
- Paltas (Loja): 5,2164 ng/uL.
- Podocarpus (Zamora Chinchipe): 11,0660 ng/uL.

El presente estudio es el primero en determinar la concentración de δ y γ tocotrienol en extractos de la especie de *Bixa orellana*. La razón por la cual se realizó este proyecto es que diversos estudios afirman que los tocotrienoles han sido descritos como protectores para lesiones inducidas por accidente cerebrovascular, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de piel, reducción del colesterol, contramedidas de diabetes y radiación (Pineda, 2015), es decir debido a su gran potencial terapéutico.

En un estudio que determinó las concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en distintos cultivos de zonas europeas se detalla, que las diferencias entre los valores de distintos estudios se debe probablemente a los métodos empleados, en donde varían la selectividad, sensibilidad de equipos, así como también existen varias metodologías que se usan para identificar y separar estos compuestos (Amaral,Casal, Alves, Seabra & Oliveira, 2006), por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio son confiables.

CONCLUSIONES

- Se determinó un procedimiento para obtener extractos de *Bixa orellana*, con fines de análisis de la riqueza presente de tocotrienoles.
- Se diseñó un método simple, preciso, seguro y reproducible en GC-MS para analizar δ -tocotrienol y γ -tocotrienol en extractos de las semillas de *Bixa orellana*.
- El método analítico para determinar la concentración de δ y γ tocotrienol fue validado a través de los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud (recuperación), precisión (repetibilidad y reproducibilidad) cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos y con las normas internacionales de validación analítica.
- Se determinó la concentración de δ y γ -tocotrienol en los extractos obtenidos de *Bixa orellana*, usando el método analítico validado.
- El sector que en promedio obtuvo la mayor concentración promedio de δ -tocotrienol fue: Los Encuentros de la provincia de Zamora Chinchipe con 62,2889 ng/uL.
- El sector que en promedio obtuvo la mayor concentración de γ -tocotrienol promedio fue: El Podocarpus de la provincia de Zamora Chinchipe con 11,0660 ng/uL.

RECOMENDACIONES

- Con la finalidad de presentar resultados confiables y precisos, las condiciones de trabajo (material, equipos, temperatura, estándares, reactivos, etc.) deben ser las mismas para todo el método analítico.
- Es de gran importancia que el laboratorio (analistas) tenga claro cuáles son los criterios de aceptación del método previamente diseñado, para establecer la validación.
- La validación del método analítico debe efectuarse de forma metódica, ordenada y confiable.
- Es importante que todo el método analítico sea trabajado con viales, frascos, balones, etc., de color ámbar.
- Una vez colocado el derivatizante se debe esperar durante 15 minutos para realizar la lectura en el GC-MS.
- Sobre el rendimiento de los sectores que presentan mayor concentración promedio de compuestos, se recomienda realizar un muestreo más olgado para determinar las concentraciones de tocotrienoles (bajo las mismas condiciones) y así realizar un estudio comparativo con el presente trabajo.
- Se recomienda realizar estudios taxonómicos para determinar si hay relación o no entre las distintas especies de *Bixa orellana*, y la concentración de tocotrienoles en las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. (Corpus, Ed.). Rosario, Argentina.
- Amaral, J. S., Casal, S., Rui Alves, M., Seabra, R. M., & Oliveira, B. P. P. (2006). Tocopherol and tocotrienol content of hazelnut cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1329–1336. <https://doi.org/10.1021/jf052329f>
- Anderson, R. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. *Unodc*, 1, 76. <https://doi.org/ST/NAR/41>
- Barrie Tan, A. (2014). Tocotrienols and geranylgeraniol from *Bixa orellana* byproducts PCT/US2004/011366. EEUU. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US6350453>.
- Barrie Tan, A., & Sunderland, J. F. (2003). United States Patent: Byproducts, Tocotrienols and Geranylgeraniol from *Bixa orellana*. EEUU. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.42.30033>.(51)
- Burneo, M. (2012). *Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de ascaridol en el extracto hexánico de Chenopodium ambrosioides (paico) mediante cromatografía de gases – FID*. Universidad técnica Particular de Loja.
- Carrillo, J. (2016). *Distribución Geográfica y Potencial de Bixa orellana L. (achiote) en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Castro, I. (2006). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000200001
- Compadre, C., Breen, P., Aykin, N., Hauer, M., Enriquez, R., Kharade, S., Pineda, S. (2015). Preparation and use of a composition for prevention and mitigation of the effects of radiation. Retrieved from <https://www.google.com/patents/WO2015039029A1?cl=en>
- Cosentino, H. M., Takinami, P. Y. I., & del Mastro, N. L. (2016). Comparison of the ionizing radiation effects on cochineal, annatto and turmeric natural dyes. *Radiation Physics and Chemistry*, 124, 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.09.016>
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services*. <https://doi.org/http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>
- Franco, C., Fabri, E., Barreiro, M., Manfiolli, M., & Rucker, N. (2008). *Urucum; sistemas de produção para o Brasil*. Brasilia, Brazil: João Pessoa, PB (Brazil).
- Giorgi, A., De Marinis, P., Granelli, G., Chiesa, L. M., Panseri, S., Giorgi, A., Panseri, S. (2013). Secondary Metabolite Profile, Antioxidant Capacity, and Mosquito Repellent Activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon Region. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/409826>
- González, A. (1992). Colección y mantenimiento de germoplasma de achiote (*Bixa orellana* L.) en la Amazonía peruana. *Folia Amazónica*, 49–63.

- González, Y. (2015). *Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de Baccharis oblongifolia*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil Y de Cooperación Industrial*, (122), 35–41.
- Hui-Ling Che, Doryn Meam-Yee Tan, Puvaneswari Meganathan, Yee-Lin Gan, G. A. R. and J.-Y. F. (2015). Validation of a HPLC/FLD Method for Quantification of Tocotrienols in Human Plasma. *PubMed*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/357609>
- Karchuli, M. S., & Ganesh, N. (2009). Protective effect of *Bixa orellana L.* against radiation induced chromosomal aberration in Swiss albino mice. *International Journal Phytomedicine*. 1, 18–21. <https://doi.org/10.5138/ijpm.2009.0975.0185.05789>
- Kiokias, S., & Gordon, M. H. (2003). Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry*, 83(4), 523–529. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00148-1)
- Moraes, M. N., Zabot, G. L., & Meireles, M. A. A. (2015). Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin production. *Journal of Supercritical Fluids*, 96, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.09.007>
- Morrillas, P., Barwick, V., Ellison Stephen, Engman, J., & Magnusson, B. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Retrieved from www.eurachem.org
- Orata, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 83–156. <https://doi.org/10.5772/33098>
- Organización Mundial de la salud (OMS). (2000). *Situación reglamentaria de los medicamentos*. OMS/TRM/98.1. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/whozip58s/whozip58s.pdf>
- Organización Mundial de la salud (OMS). (2003). Medicina tradicional Informe de la Secretaría. *56ª Asamblea Mundial De La Salud, A/56(18)*, 1–5. Retrieved from http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- Pineda, E. N. (2015). *Preparation and Radrioprotective effects of a standardized Tocotrienol containing extract isolated from Annatto seeds (Bixa Orellana L .)*. University of Arkansas. University of Arkansas. Retrieved from <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1683/1/T-SENESCYT-00800.pdf>
- Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., & Nair, M. G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J. Agric. Food Chem.*, 53(23), 9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf051399j>
- Ricard Boqué, Alicia Maroto, Jordi Riu, & Rius, F. X. (2002). Validation of Analytical Methods. *Grasas Y Aceites*, 53(1), 16. <https://doi.org/10.3989/gya.2002.v53.i1.295>
- Rodríguez, S. C., Pellerano, I. ;, Romero, R. G. ;, Acevedo, C. H. ;, & Y Vázquez, H. A. (2012).

- Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Revista UMBAGA*, 7, 55–71.
- Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A., & Muñoz, J. F. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-2>
- Russell, K., Omoruyi, F., Pascoe, K., & Morrison, E. (2008). *The hypoglycaemic activity of Bixa orellana extract in the dog* (Methods an). PubMed. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773125>
- Sandoval, S. (2010). Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. *Zhurnal Eksperimental'noi I Teoreticheskoi Fiziki*, 66. Retrieved from [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Técnica_1_validación_de_Métodos_y_determinación_de_la_incertidumbre_de_la_medición_1.pdf)
- Satyanitra, M., Kulkarni, S., Ghosh, S., Mullaney, C., Condliffe, D., & Srinivasan, V. (2011). Mechanism of radioprotection by δ -tocotrienol: pharmacokinetics, pharmacodynamics and modulation of signalling pathways. PMC. *Radiation Research*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500808/>
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos* (Primera Ed). Bogotá, Colombia: Cyted.
- Silva, S., Amaral, C., & Reboucas T. (2010). Adoption of conservation practices on farm and selection of varieties by producers of annatto in the city of Vitoria da Conquista-BA. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 5, 106–113.
- Singh, V. K., Wise, S. Y., Scott, J. R., Romaine, P. L. P., Newman, V. L., & Fatanmi, O. O. (2014). Radioprotective efficacy of delta-tocotrienol, a vitamin e isoform, is mediated through granulocyte colony-stimulating factor. *Life Sciences*, 98(2), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.01.065>
- Valencia, J. P. (2008). Estandarización De La Técnica De Cromatografía De Gases Acoplada a Espectrometría De Masas Para La Identificación Y Cuantificación De Metilésteres De Ácidos. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Vilar, D. D. A., Vilar, M. S. D. A., Moura, T. F. A. D. L. E., Raffin, F. N., Oliveira, M. R. De, Franco, C. F. D. O., Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa Orellana L.*: A review. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/857292>
- Wright, J., Pearce, B., Parker, R., & Quereshi, A. (2015). Tocotrienols in the treatment of hypercholesterolemia, hyperlipidemia and thromboembolic disorders. EP0 421 419 A2 Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/d76a59acc78c510808b4/EP0421419A2.pdf>

ANEXOS

ANEXO I: Especificidad del método.

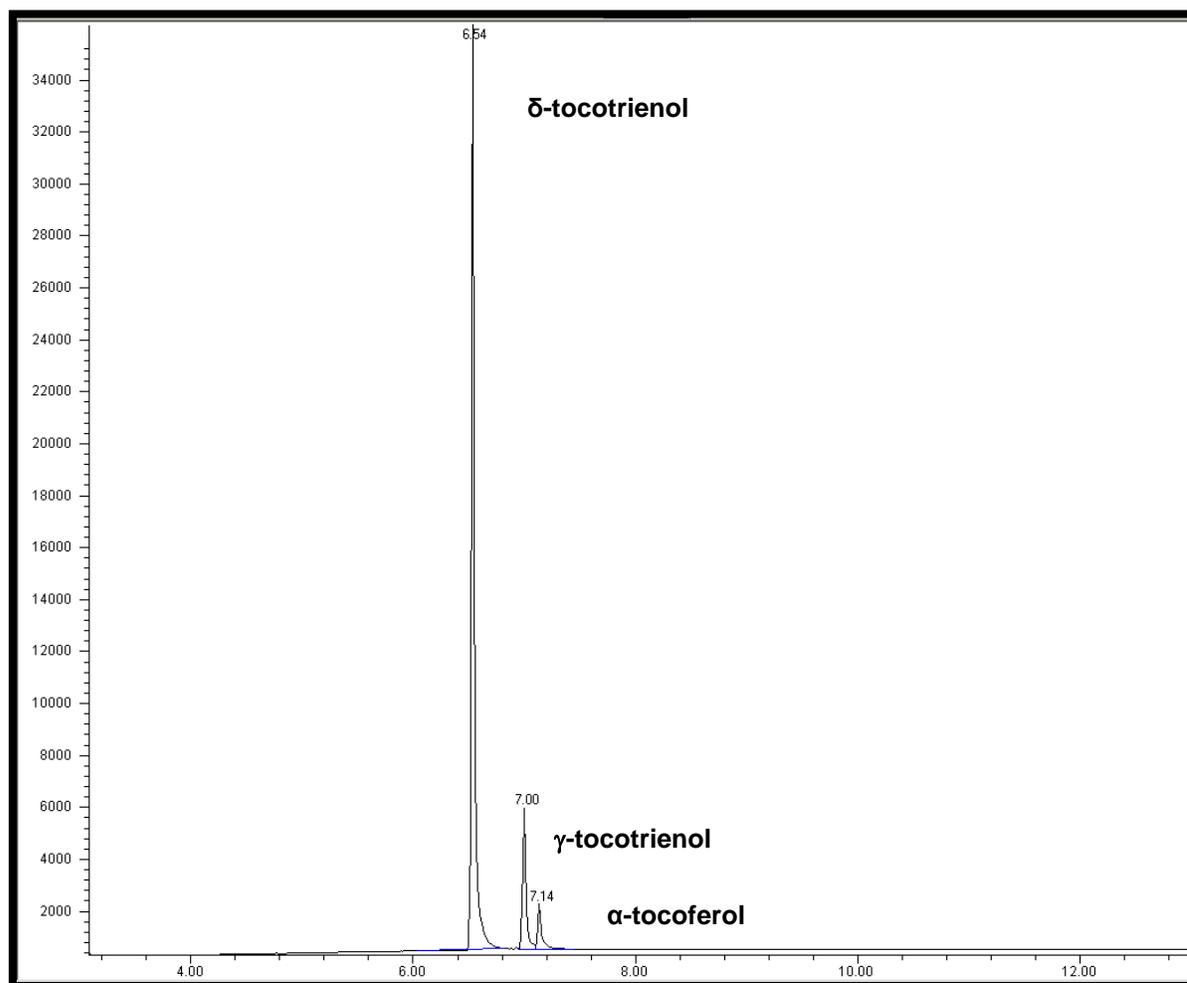


Figura 9. Cromatograma de δ y γ -tocotrienol y α -tocoferol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

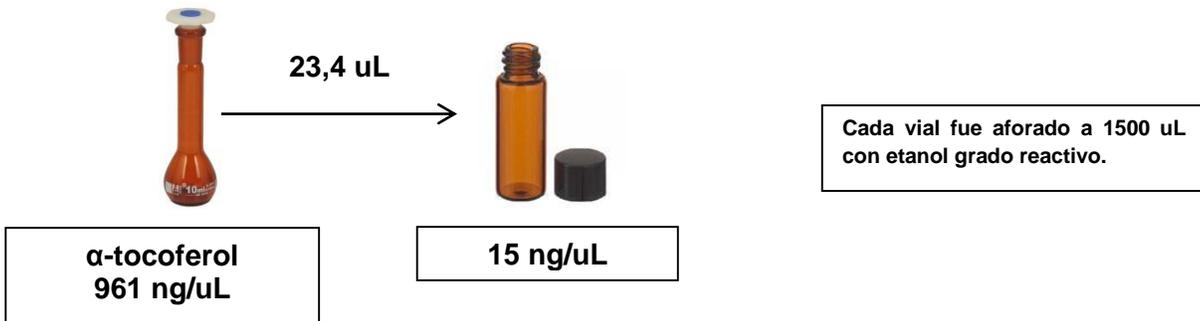
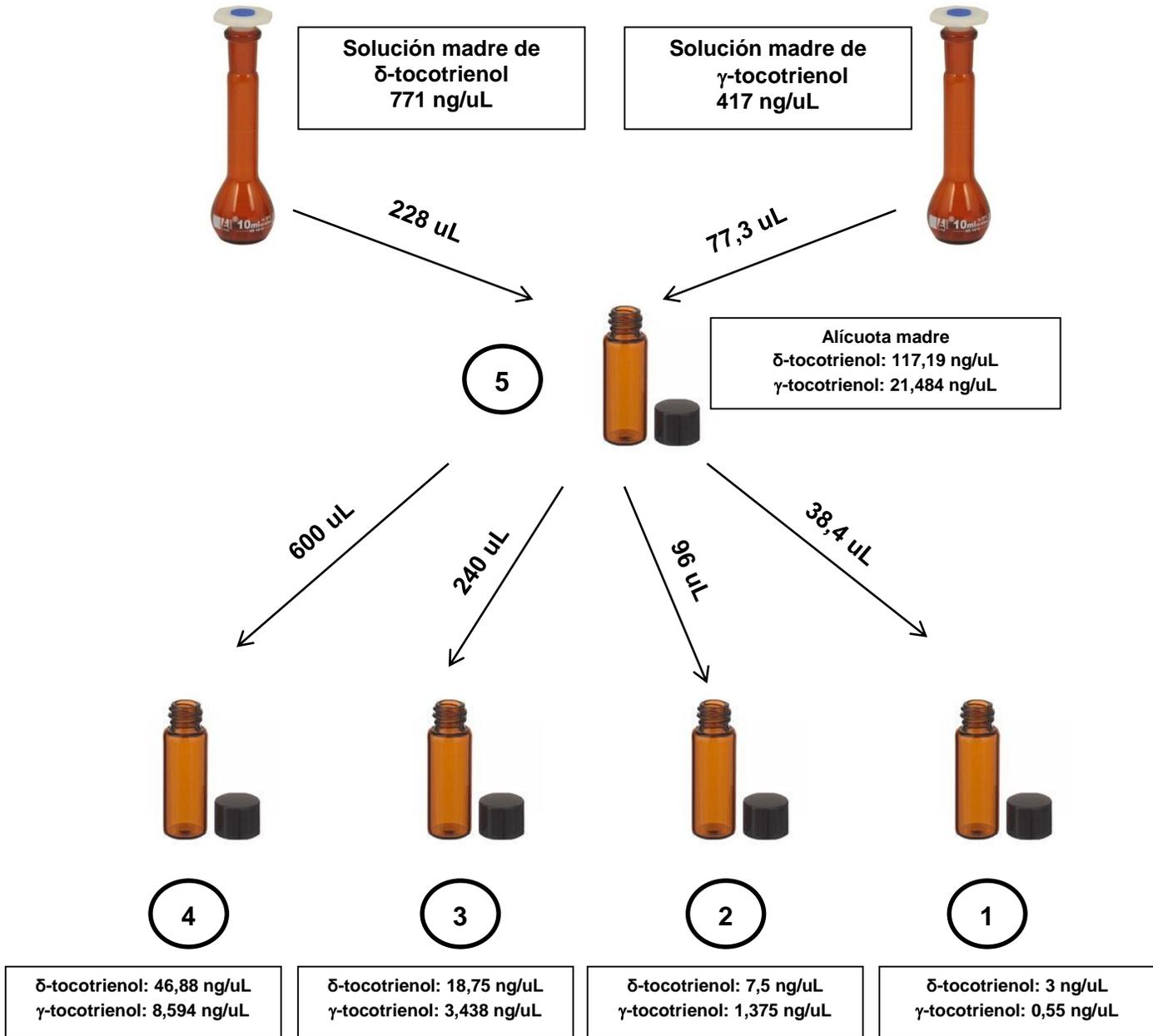
Tabla 23. Tiempos de retención y pesos moleculares de δ y γ -tocotrienol y de α -tocoferol.

Metabolito	Tiempo de retención	Peso molecular
δ -tocotrienol	6.52	468
γ -tocotrienol	6.98	482
α -tocoferol	7.12	502

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

ANEXO II: Diagrama para la elaboración del método analítico.



ANEXO III: Relación δ y γ -tocotrienol sobre α -tocoferol.

En la Tabla 24 se presenta los resultados conseguidos por cada operario a través de la división realizada de los datos obtenidos en GC-MS para δ -tocotrienol para los datos obtenidos en GC-MS del Estándar Interno (α -tocoferol) para cada concentración (ng/uL). Posteriormente se realizó un promedio de los datos obtenidos para cada concentración, de tal forma que se pueda construir la curva de calibración que se muestra en la Tabla 7 en resultados.

Tabla 24. Relación δ -tocotrienol sobre α -tocoferol.

	3 ng/uL	7,5 ng/uL	18,75 ng/uL	46,88 ng/uL	117,19 ng/uL
Operario 1	0,4795	0,9981	2,8918	7,8947	16,9359
	0,3847	0,9689	2,9370	7,0691	19,0797
	0,4273	1,0418	3,0642	8,7464	18,9411
	0,3773	1,1168	3,2413	8,5938	19,1189
Operario 2	0,4000	0,9487	2,8963	7,4902	19,1264
	0,4292	1,1271	2,9795	7,9729	20,9166
	0,4036	1,1628	2,9196	8,2180	19,7882
	0,4227	0,9251	2,9209	7,7260	17,2161
Operario 3	0,4558	1,1792	2,7625	6,5221	18,3754
	0,4384	1,0913	3,0642	7,6649	16,1920
	0,4123	1,0512	2,7349	8,6221	17,5832
	0,4301	1,0956	2,7398	6,8908	16,4386

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

En la Tabla 25 se presenta los resultados conseguidos por cada operario a través de la división realizada de los datos obtenidos en GC-MS para γ -tocotrienol para los datos obtenidos en GC-MS del Estándar Interno para cada concentración (ng/uL). Posteriormente se realizó un promedio de los datos obtenidos para cada concentración, de tal forma que se pueda construir la curva de calibración que se muestra en la Tabla 8 en resultados.

Tabla 25. Relación γ -tocotrienol sobre α -tocoferol.

	0,55 ng/uL	1,375 ng/uL	3,4375 ng/uL	8,59375 ng/uL	21,484375 ng/uL
Operario 1	0,1364	0,2779	0,5397	1,3183	2,6346
	0,0749	0,2434	0,5099	1,0811	2,9672
	0,0810	0,2643	0,4418	1,4329	2,9658
	0,0909	0,2079	0,5859	1,3463	3,0243
Operario 2	0,1303	0,2131	0,5198	1,2154	3,1222
	0,1093	0,2483	0,5232	1,2989	3,3550
	0,1145	0,2685	0,5410	1,2868	3,1267
	0,0987	0,2109	0,5424	1,2791	2,6713
Operario 3	0,1077	0,2719	0,5590	1,1426	3,1648
	0,1057	0,2664	0,4418	1,2785	2,9568
	0,1121	0,2552	0,5225	1,4420	3,1846
	0,1069	0,2447	0,6170	1,3153	3,0279

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

ANEXO IV: Datos para calcular los límites máximos y mínimos de la curva de calibración.

En la Tabla 26 se describen los datos para determinar los límites máximos y mínimos (tabla 7) para la curva de δ -tocotrienol. Primeramente se determinó la pendiente mínima y máxima, tomando el menor valor de entre las 6 curvas, de esta misma manera se determinó el intercepto mínimo y máximo.

Tabla 26. Datos para determinar los límites máximos y mínimos de δ -tocotrienol.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
m_min	0,1285	0,1450	0,1623	0,1750	0,1443	0,1274
m_max	0,1620	0,1450	0,1672	0,1582	0,1686	0,1768
b_min	-0,7362	-0,9333	-0,3362	-0,5705	-0,8863	-1,2125
b_max	1,1835	1,1813	-0,0593	0,0128	0,5041	1,1246
b	0,2236	0,1240	-0,1977	-0,2788	-0,1911	0,2000
m	0,1453	0,1635	0,1648	0,1801	0,1565	0,1521
Sxy	0,5695	0,6274	0,0821	0,1731	0,4125	0,8381
R²	0,9974	0,9975	1,0000	0,9998	0,9988	0,9949

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

	Promedio
m_min	0,1471
m_max	0,1675
b_min	-0,7792
b_max	0,7391
b	-0,0200
m	0,1604
Sxy	0,4504
R²	0,9981

	Min	Max
Pendiente	0,1274	0,1768
Intercepto	-1,2125	1,1835

Para determinar el límite mínimo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Límite mínimo} = m_{\min} * \text{concentración} + b_{\min}$$

Para determinar el límite máximo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Límite máximo} = m_{\max} * \text{concentración} + b_{\max}$$

Donde:

m_{\min} = pendiente mínima

m_{\max} = pendiente máxima

b_{\min} = intercepto mínimo

b_{\max} =intercepto máximo

Concentración=concentraciones utilizadas para la curva

En la Tabla 27 se describen los datos para determinar los límites máximos y mínimos (tabla8) para la curva de γ -tocotrienol. Primeramente se determinó la pendiente mínima y máxima, tomando el menor valor de entre las 6 curvas, de esta misma manera se determinó el intercepto mínimo y máximo.

Tabla 27. Datos para determinar los límites máximos y mínimos de γ -tocotrienol.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
m_min	0,1019	0,1251	0,1275	0,1071	0,1309	0,1291
m_max	0,1359	0,1472	0,1456	0,1380	0,1574	0,1473
b_min	-0,0398	-0,1051	0,0275	-0,0705	-0,1112	-0,0125
b_max	0,3168	0,1257	0,0782	0,2540	0,1664	0,1778
b	0,1385	0,0103	0,0528	0,0917	0,0276	0,0827
m	0,1189	0,1361	0,1431	0,1226	0,1441	0,1382
Sxy	0,1058	0,0685	0,0150	0,0963	0,0823	0,0565
R²	0,9960	0,9987	0,9999	0,9969	0,9984	0,9992

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

	Promedio
m_min	0,1036
m_max	0,1452
b_min	-0,0519
b_max	0,1865
b	0,0673
m	0,1339
Sxy	0,0707
R²	0,9982

	Min	Max
Pendiente	0,1019	0,1574
Intercepto	-0,1112	0,3168

Para determinar el límite mínimo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Límite mínimo} = m_{\min} * \text{concentración} + b_{\min}$$

Para determinar el límite máximo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Límite máximo} = m_{\max} * \text{concentración} + b_{\max}$$

Donde:

m_{\min} = pendiente mínima

m_{\max} = pendiente máxima

b_{\min} = intercepto mínimo

b_{\max} = intercepto máximo

Concentración = concentraciones utilizadas para la curva

Anexo V: Repetibilidad y Reproducibilidad, ANOVA.

Repetibilidad y Reproducibilidad:

Para establecer la precisión del método analítico se determinó la repetibilidad y reproducibilidad, a través del uso del análisis ANOVA de un factor en el programa Excel 2010 (figuras 10, 11, 12, 13, 14,15); tomando los datos de las réplicas (n=4) de tres concentraciones para δ -tocotrienol (3; 7,55 y 46,88 ng/mL), tablas 28,29, 30 y tres para γ -tocotrienol (1,375; 8,594 y 21,484 ng/mL) tablas 31, 32, 33. Analizando los coeficientes de variación obtenidos, así como también comparando el F crítico con el F calculado.

δ -tocotrienol:

Tabla 28. Datos de réplicas de la concentración 3 ng/uL de δ -tocotrienol.

3 ng/uL	Operario 1	Operario 2	Operario 3
0,4217	0,4795	0,4000	0,4558
	0,3847	0,4292	0,4384
	0,4273	0,4036	0,4123
	0,3773	0,4227	0,4301

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	1.668875296	0.417218824	0.00221158		
Columna 2	4	1.655463202	0.413865801	0.00020275		
Columna 3	4	1.736600716	0.434150179	0.00032694		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.000945826	2	0.000472913	0.51754826	0.612694949	4.256494729
Dentro de los grupos	0.008223808	9	0.000913756			
Total	0.009169634	11				
Sr	0.030228404	7.17%	<10%			
SL^2	-0.000110211					
SR	0.030228404	7.17%	<15%			

Figura 10. Análisis ANOVA de la concentración 3 ng/uL de δ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 29. Datos de réplicas de la concentración 7,55 ng/uL de δ -tocotrienol.

7,55 ng/uL	Operario 1	Operario 2	Operario 3
1,0589	0,9981	0,9487	1,1792
	0,9689	1,1271	1,0913
	1,0418	1,1628	1,0512
	1,1168	0,9251	1,0956

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	4.1257553	1.031438825	0.00413878		
Columna 2	4	4.163774315	1.040943579	0.01473545		
Columna 3	4	4.417307309	1.104326827	0.00289428		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.012560583	2	0.006280292	0.86551036	0.453113124	4.256494729
Dentro de los grupos	0.065305543	9	0.007256171			
Total	0.077866126	11				
Sr	0.085183164	8.04%	<10%			
Sl^2	-0.00024397					
SR	0.085183164	8.04%	<15%			

Figura 11. Análisis ANOVA de la concentración 7,55 ng/uL de δ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 30. Datos de réplicas de la concentración 46,88 ng/uL de δ -tocotrienol.

46,88 ng/uL	Operario 1	Operario 2	Operario 3
7,8086	7,8947	7,4902	6,5221
	7,0691	7,9729	7,6649
	8,7464	8,2180	8,6221
	8,8858	7,7260	6,8908

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	32.59602287	8.149005716	0.71022603		
Columna 2	4	31.40717373	7.851793432	0.09844854		
Columna 3	4	29.69992555	7.424981386	0.8637649		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.059619859	2	0.52980993	0.95036611	0.422221916	4.256494729
Dentro de los grupos	5.017318402	9	0.557479822			
Total	6.076938261	11				
Sr	0.746645714	9.56%	<10%			
SL^2	-0.006917473					
SR	0.746645714	9.56%	<15%			

Figura 12. Análisis ANOVA de la concentración 46,88 ng/uL de δ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

γ-tocotrienol:

Tabla 31. Datos de réplicas de la concentración 1,375 ng/uL de γ-tocotrienol.

1,375 ng/uL	Operario 1	Operario 2	Operario 3
0,2477	0,2779	0,2131	0,2719
	0,2434	0,2483	0,2664
	0,2643	0,2685	0,2552
	0,2079	0,2109	0,2447

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	0.993525437	0.248381359	0.0009288		
Columna 2	4	0.940885735	0.235221434	0.00078663		
Columna 3	4	1.038206653	0.259551663	0.00014648		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001186559	2	0.00059328	0.95592167	0.420290663	4.256494729
Dentro de los grupos	0.005585726	9	0.000620636			
Total	0.006772285	11				
Sr	0.024912571	10.06%	<10%			
SL^2	-6.83915E-06					
SR	0.024912571	10.06%	<15%			

Figura 13. Análisis ANOVA de la concentración 1,375 ng/uL de γ-tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 32. Datos de réplicas de la concentración 8,594 ng/uL de γ -tocotrienol.

8,594 ng/uL	Operario 1	Operario 2	Operario 3
1,2864	1,3183	1,2154	1,1426
	1,0811	1,2989	1,2785
	1,4329	1,2868	1,4420
	1,3463	1,2791	1,3153

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	5.178625735	1.294656434	0.02265258		
Columna 2	4	5.080103534	1.270025883	0.0013944		
Columna 3	4	5.306735343	1.326683836	0.0004651		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.006456723	2	0.003228361	0.39511464	0.684736395	4.256494729
Dentro de los grupos	0.073536259	9	0.008170695			
Total	0.079992982	11				
Sr	0.090391899	7.03%	<10%			
SL^2	-0.001235584					
SR	0.090391899	7.03%	<15%			

Figura 14. Análisis ANOVA de la concentración 8,594 ng/uL de γ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 33. Datos de réplicas de la concentración 21,484 ng/uL de γ -tocotrienol.

21,484 ng/uL	Operario 1	Operario 2	Operario 3
3,0168	2,6346	3,1222	3,1648
	2,9672	3,3550	2,9568
	2,9658	3,1267	3,1846
	3,0243	2,6713	3,0279

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	11.59197793	2.897994483	0.03157574		
Columna 2	4	12.27515147	3.068787868	0.08202417		
Columna 3	4	12.3341241	3.083531024	0.01198691		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.085082065	2	0.042541033	1.01621407	0.400010424	4.256494729
Dentro de los grupos	0.376760473	9	0.041862275			
Total	0.461842538	11				
Sr	0.204602724	6.78%	<10%			
SL^2	0.000169689					
SR	0.205016985	6.80%	<15%			

Figura 15. Análisis ANOVA de la concentración 21,484 ng/uL de γ -tocotrienol.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Anexo VI: Recuperación de δ y γ -tocotrienol.

Tabla 34. Datos para determinar la Recuperación de δ y γ -tocotrienol.

	Relación Delta	Concentración Delta	R Delta %	Relación Gamma	Concentración Gama	R Gamma %
E	11,3403	76,5259		0,6621	4,4034	
	10,8855	67,9423		0,7267	2,0999	
	12,4720	75,5369		0,7490	5,0023	
	13,0661	78,2354		0,8149	5,3969	
E + 1	12,6029	85,2180	107%	0,7544	5,1797	105%
	13,0820	81,3472	115%	0,7719	2,4317	92%
	11,6428	70,4645	90%	0,7784	5,2149	94%
	12,6217	75,5371	93%	0,8372	5,5564	93%
E + 2	13,7352	93,0130	111%	0,9600	6,9084	120%
	13,8657	86,1303	114%	0,9921	4,0493	117%
	13,7186	83,1630	100%	0,9718	6,6152	104%
	13,3425	79,9134	93%	0,9433	6,3163	93%
E + 3	14,1931	96,1649	101%	1,0971	8,0611	103%
	16,6751	103,2761	119%	1,3382	6,5912	119%
	18,1627	110,3492	117%	1,3325	9,2257	109%
	16,9444	101,7815	105%	1,2588	8,5755	97%

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla resumen de los datos obtenidos para calcular los porcentajes de recuperación en cada compuesto (tablas 17 y 18). La relación delta y relación gamma, se obtienen a través de la división del resultado dado por el GC-MS de cada compuesto sobre el estándar interno. La concentración de cada compuesto se obtiene al reemplazar la relación de cada compuesto en la ecuación de la recta. Finalmente los porcentajes de recuperación se obtienen mediante la división de la concentración de cada compuesto del extracto enriquecido sobre la concentración del extracto más la concentración trabajada para cada compuesto.

$$R = \frac{\text{Concentración extracto enriquecido}}{\text{Concentración extracto} + \text{concentración trabajada}}$$

ANEXO VII: Concentración de δ y γ -tocotrienol en los extractos de *Bixa orellana* por sectores.

Tabla 35. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Jamboé.

N	Sector	Código	Concentraciones ng/uL	
			δ	γ
1	La Pituca	BO - 121	90,9491	12,2221
2	La Pituca	BO - 122	67,4180	6,1019
3	La Pituca	BO - 123	35,4191	4,7303
4	La Sakatza	BO - 124	18,4926	1,9874
5	La Sakatza	BO - 125	29,4297	2,0162
6	La Sakatza	BO - 126	53,6043	4,0520
7	La Sakatza	BO - 127	12,1863	0,5505
8	La Sakatza	BO - 128	33,4357	1,4750
9	La Pituca	BO - 129	59,1648	6,8639
10	La Pituca	BO - 130	52,7868	5,3146
11	La Pituca	BO - 131	25,0911	2,7703
12	Numbami NCI	BO - 132	67,4774	7,2047
13	Numbami NCI	BO - 133	31,8868	2,7577
14	Numbami NCI	BO - 134	49,4276	4,6651
15	Numbami NCI	BO - 135	37,9226	3,3014
16	Numbami NCI	BO - 136	45,9319	4,5495
17	Numbami NCI	BO - 137	46,7639	3,3440
18	Numbami NCI	BO - 138	31,2939	4,4823
19	Numbami NCI	BO - 139	34,2622	3,7472
20	Numbami NCI	BO - 140	30,1742	2,2422
21	Numbami	BO - 141	36,1515	2,3014
22	Numbami	BO - 142	46,1290	4,8881
23	Numbami	BO - 143	31,8275	2,6591
24	Numbami	BO - 144	28,5437	2,7270
25	Numbami	BO - 145	62,9537	4,6876
26	Romerillo B	BO - 146	64,5004	5,8526
27	Romerillo B	BO - 147	54,8355	5,8142
28	Romerillo A	BO - 148	48,3123	3,7585
29	Romerillo A	BO - 149	10,3678	0,3232
30	Romerillo A	BO - 150	80,2636	5,4861

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 36. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Los Encuentros.

N	Sector	Código	Concentraciones ng/uL	
			δ	γ
31	Los Encuentros	BO - 151	84,2754	6,6418
32	Los Encuentros	BO - 152	62,5029	7,4514
33	Paquisha	BO - 153	71,6866	14,0770
34	Paquisha	BO - 154	57,6409	5,4007
35	Bellavista	BO - 155	84,3064	4,2470
36	Bellavista	BO - 156	73,8764	12,6262
37	Bellavista	BO - 157	63,3179	4,6790
38	Bellavista	BO - 158	75,5208	15,8243
39	Río Canchi	BO - 159	72,1110	14,2589
40	Río Canchi	BO - 160	89,8672	180306
41	Río Canchi	BO - 161	72,6338	17,7806
42	Río Canchi	BO - 162	78,9677	16,3482
43	Río Canchi	BO - 163	64,8894	18,3274
44	Camino Paquisha	BO - 164	44,0855	3,1124
45	Camino Paquisha	BO - 165	43,5971	11,8886
46	Camino Paquisha	BO - 166	41,5753	6,9887
47	Camino Paquisha	BO - 167	45,5062	9,1304
48	Camino Paquisha	BO - 168	48,7795	12,3630
49	La Merced	BO - 169	56,5064	15,1668
50	La Merced	BO - 170	66,2917	9,4519
51	La Merced	BO - 171	49,3063	9,7225
52	La Merced	BO - 172	36,8861	7,5290
53	La Merced	BO - 173	57,1005	13,0575
54	La Merced	BO - 174	59,4950	10,8494
55	La Merced	BO - 175	81,2850	11,5863
56	Anancay	BO - 176	74,6259	10,1384
57	Los Encuentros	BO - 177	61,2799	12,2901
58	Los Encuentros	BO - 178	50,6133	8,1299
59	Los Encuentros	BO - 179	66,7438	13,8745
60	Los Encuentros	BO - 180	33,4932	2,2240

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 37. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Paltas.

N	Sector	Código	Concentraciones ng/uL	
			δ	γ
61	Santa Cecilia	BO - 181	47,6692	2,7561
62	Santa Cecilia	BO - 182	29,8946	2,9349
63	Santa Cecilia	BO - 183	37,6698	3,2919
64	Santa Cecilia	BO - 184	50,9236	3,2764
65	Santa Cecilia	BO - 185	28,1775	5,7122
66	Santa Cecilia	BO - 186	40,8723	4,0075
67	Santa Cecilia	BO - 187	66,7335	4,8199
68	Santa Cecilia	BO - 188	56,7055	5,1796
69	Santa Cecilia	BO - 189	15,1103	1,7137
70	Lauro Guerrero	BO - 190	36,4678	5,2888
71	Suanamá	BO - 191	24,8209	10,4371
72	San Francisco	BO - 192	46,4939	8,0365
73	San Francisco	BO - 193	60,2396	6,4621
74	San Francisco	BO - 194	43,2854	3,8828
75	San Francisco	BO - 195	45,8349	5,2857
76	San Francisco	BO - 196	34,4396	6,7778
77	San Francisco	BO - 197	33,5138	12,6007
78	San Francisco	BO - 198	23,4277	3,6226
79	San Francisco	BO - 199	30,0261	7,8151
80	San Francisco	BO - 200	17,1441	3,6907
81	San Francisco	BO - 201	19,9462	1,8579
82	San Francisco	BO - 202	32,1689	6,5595
83	San Francisco	BO - 203	38,2983	8,9641
84	San Francisco	BO - 204	37,3277	5,3672
85	San Francisco	BO - 205	49,7603	14,1614
86	San Francisco	BO - 206	13,4418	0,7605
87	San Francisco	BO - 207	15,0852	1,2247
88	San Francisco	BO - 208	56,3418	4,9717
89	San Francisco	BO - 209	68,0299	2,6379
90	San Francisco	BO - 210	48,0904	2,3950

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

Tabla 38. Concentración de tocotrienoles en los extractos de Podocarpus.

N	Sector	Código	Concentraciones ng/uL	
			δ	γ
91	Macará	BO - 211	71,2415	12,5521
92	Macará	BO - 212	32,0212	4,0056
93	La Mandalá	BO - 213	38,0975	11,4286
94	La Mandalá	BO - 214	40,2329	10,9542
95	La Mandalá	BO - 215	64,0349	12,8235
96	La Mandalá	BO - 216	56,6695	10,9085
97	La Mandalá	BO - 217	52,3804	7,0110
98	La Mandalá	BO - 218	36,6301	8,6894
99	La Mandalá	BO - 219	60,8613	10,6321
100	La Mandalá	BO - 220	26,9571	8,0747
101	Piedratabla	BO - 221	24,0161	7,4683
102	Piedratabla	BO - 222	22,9402	6,6242
103	Piedratabla	BO - 223	26,0176	5,3688
104	Piedratabla	BO - 224	21,1944	7,1883
105	Piedratabla	BO - 225	22,8767	6,9625
106	Piedratabla	BO - 226	22,4092	6,3564
107	Piedratabla	BO - 227	65,5168	16,1897
108	Piedratabla	BO - 228	59,9009	12,3310
109	Piedratabla	BO - 229	39,8658	9,5289
110	Piedratabla	BO - 230	72,1460	17,0405
111	Piedratabla	BO - 231	81,4549	18,9781
112	Piedratabla	BO - 232	45,6073	10,5336
113	Piedratabla	BO - 233	59,0405	13,9443
114	Piedratabla	BO - 234	61,1460	15,0328
115	Piedratabla	BO - 235	77,7586	16,4952
116	Piedratabla	BO - 236	70,3163	14,8335
117	Piedratabla	BO - 237	67,5928	15,2632
118	Piedratabla	BO - 238	36,2789	10,9937
119	Piedratabla	BO - 239	29,6445	10,2411
120	Piedratabla	BO - 240	42,3735	13,5268

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.