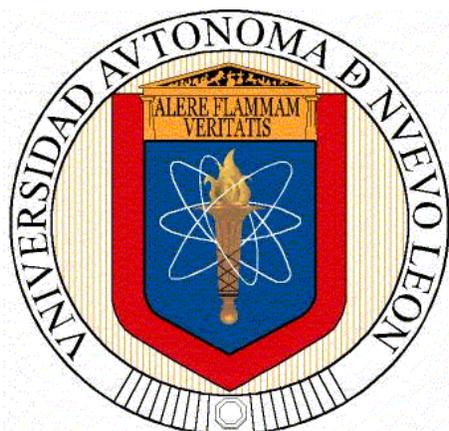


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

Evaluación de la factibilidad del aprovechamiento del subproducto de la desodorización de aceite de soya (*Glycine max* L.) como fuente de fitoesteroles, tocoferoles y escualeno

POR

JOSE RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN ALIMENTOS

FEBRERO DE 2015

Evaluación de la factibilidad del aprovechamiento del subproducto de la desodorización de aceite de soya (*Glycine max* L.) como fuente inocua de fitoesteroles, tocoferoles y escualeno

Comité de Tesis

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Presidente

Dr. Carlos Javier Aguilera González
Secretario

Dra. María Guadalupe Alanís Guzmán
Vocal

Dr. Juan Gabriel Báez González
Vocal

Dr. Sergio Moreno Limón
Vocal

Evaluación de la factibilidad del aprovechamiento del subproducto de la desodorización de aceite de soya (*Glycine max* L.) como fuente inocua de fitoesteroles, tocoferoles y escualeno

Dirección de Tesis

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Director

Dr. Porfirio Caballero Mata
Director externo

DEDICATORIA

A Dios por permitirme existir y compartir esta vida justamente con Ustedes...

A mis Padres Don José Rodríguez Esquivel † y Doña Socorro Rodríguez de Rodríguez por haber formado la maravillosa familia que somos, por habernos hecho a todos gente de bien y porque son las mejores personas que he conocido.

A mi esposa Dra. María Adriana Núñez González y mis maravillosos hijos José Antonio Rodríguez Núñez y Alejandro Rodríguez Núñez, porque son la razón de todo esto... porque los amo.

"Detrás de cada logro hay otro desafío"

Madre Teresa de Calcuta

A G R A D E C I M I E N T O S

A mis Directores de Tesis Dr. Carlos Abel Amaya Guerra y Dr. Porfirio Caballero Mata, por su valiosa asesoría y apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

Al Comité Asesor de esta tesis: Dra. María Guadalupe Alanís Guzmán, Dr. Carlos Javier Aguilera González, Dr. Juan Gabriel Báez Gonzales y Dr. Sergio Moreno Limón, mi reconocimiento por su asesoría y el tiempo invertido en la exhaustiva revisión y corrección especializada de la misma, lo cual la enriqueció y mejoró muchísimo.

Al personal de la Empresa que me proporcionó el material de estudio que hizo posible esta investigación.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio del Centro de Calidad del Agua: Iris, Sara y Gibrán por sus valiosos consejos y apoyo desinteresado.

A mis compañeros del Laboratorio de Ciencia de Alimentos FCB, UANL, por los gratos montos compartidos.

A CONACYT por el apoyo recibido para la obtención del Doctorado.

INDICE GENERAL

Introducción	1
Definición del problema y justificación	2
Antecedentes	3
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos particulares	30
Material y método	31
Resultados y discusión	46
Conclusiones	75
Perspectivas	76
Bibliografía	78
Anexo I. Resultados de muestras sintéticas para la validación de de Fitoesteroles y Escualeno.	
Anexo II. Reportes de análisis de Fitoesteroles esterificados y libres.	
Anexo III. Resultados de muestras sintéticas para la validación de tocoferoles.	
Anexo IV. Reportes de Análisis de Tocoferoles.	
Anexo V. Graficas de efectos principales para el análisis de plaguicidas.	
Anexo VI. Reportes del Diseño factorial para plaguicidas.	
Anexo VII. Reportes de análisis de plaguicidas.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Contenido y producción de aceite de oleaginosas	3
2	Referencias que reportan diferentes concentraciones de fitosteroles en AGDAS	8
3	Referencias que reportan diferentes concentraciones de tocoferoles en AGDAS	12
4	Retención teórica de plaguicidas a cada etapa de procesamiento el grano de soya	18
5	Plaguicidas prohibidos en diferentes organismos a nivel mundial.	20
6	Procesos usados para la extracción y purificación de muestras con contenido graso	25
7	Equipo y columnas reportadas por diferentes autores para el análisis de plaguicidas por la técnica de cromatografía de gases en muestras con matriz grasa	25
8	Plaguicidas analizados en AGDAS	32
9	Variables Independientes y sus valores codificados usados para la optimización de la purificación de escualeno, fitosteroles libres y esterificados para su análisis	33
10	Coefficientes de extinción usados para calcular la concentración de tocoferoles en los estándares de calibración para el solvente correspondiente y longitud de onda	40
11	Diseño Experimental Bifactorial para plaguicidas (2x2x3)	41
12	Condiciones cromatográficas para el análisis de plaguicidas en AGDAS	43
13	Plan del DCC y las respuestas experimentales y estimadas (% de Recuperación) para cada corrida del diseño de Fitoesteroles esterificados	46

14	Plan del DCC y las respuestas experimentales y estimadas (% de Recuperación) para cada corrida de escualeno	47
15	Plan del DCC y las respuestas experimentales y estimadas (% de Recuperación) para cada corrida del colesterol (FL)	48
16	Análisis de varianza (ANOVA) obtenido en el superficie de respuesta para: a) Fitoesteroles esterificados; b) Escualeno, c) Fitoesteroles libres (Colesterol)	49
17	Resultados de los parámetros de validación para fitoesteroles totales y escualeno	53
18	Índice de Horrat para cada uno de los compuestos validados	54
19	Valores de los parámetros de validación para δ -Tocoferol, α Tocoferol y γ -Tocoferol	59
20	Índice de Horrat para cada uno de los compuestos validados	60
21	Valores de análisis de varianza del diseño factorial para la optimización del proceso de purificación de plaguicidas	63
22	Valores de los parámetros de validación obtenidos para el análisis de plaguicidas	66
23	Índice de Horrat para cada uno de los compuestos validados	67
24	Concentración de los 19 plaguicidas analizados en AGDAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema del proceso de producción y refinación del aceite vegetal	4
2	Estructura química de Fitoesteroles	6
3	Estructura química del escualeno	9
4	Estructura química de α -, β -, γ -, y δ -tocoferoles	10
5	Ejemplos de plaguicidas Organoclorados	14
6	Ejemplos de plaguicidas Organofosforados	15
7	Desaparición de plaguicidas por tratamiento térmico	17
8	Cambios en los niveles de plaguicidas durante el proceso de extracción y refinación de aceite vegetal	18
9	Monitor de Sequía de México año 2003-2014	28
10	Afectación por sequía en el año 2011 en el sureste de Estados Unidos	29
11	Diagrama de extracción y optimización de la purificación de plaguicidas en AGDAS	43
12	Gráfica de contorno que señala la interacción de gramos de sílica y volumen de eluyente con mayor % de recuperación en el diseño para los compuestos evaluados a) Colesterol; b) Escualeno; c) Fitoesteroles esterificados	52
13	Comparación estadística de a) Dos técnicas de cuantificación; b) etapa de derivatización y sin derivatizar	55
14	Contenido de Fitoesteroles totales en AGDAS de diferente procedencia, grado de calidad y condición de cultivo.	56
15	Contenido de Fitoesteroles esterificados en AGDAS de diferente procedencia, grado de calidad y condición de cultivo.	57
16	Proporción de fitoesteroles libres y esterificados en AGDAS	58
17	Contenido de escualeno en AGDAS de diferente procedencia,	58

	grado de calidad y condición de cultivo	
18	Comparación de medias con la prueba de t de student con diseño de muestras pareadas para dos métodos de análisis para Tocoferoles HPLC–UV vs GC- MSD	61
19	Comparación de medias con la prueba de t de student con diseño de muestras pareadas para dos modalidades de cuantificación de tocoferoles Estándar Interno (Colesterol) vs Estándar Externo (Curva de calibración)	61
20	Contenido de tocoferoles en AGDAS de diferente procedencia, grado de calidad y condición de cultivo	62
21	a-c) Grafica de efectos principales para cada plaguicida donde se muestra el nivel de cada factor con el que se obtiene mayor porcentaje de recuperación de los plaguicidas evaluados	64
22	Cromatograma de plaguicidas para el análisis cuantitativo de AGDAS.	68
23	Reporte del análisis cuantitativo de plaguicidas en AGDAS.	68
24	Contraste entre el cromatograma de un estándar de plaguicidas y las muestras	69
25	Grafica de barras de los valores encontrados en el análisis de fitoesteroles totales en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y grafica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos.	71
26	Grafica de barras de los valores encontrados en el análisis de fitoesteroles esterificados en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y grafica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos	72
27	Grafica de barras de los valores encontrados en el análisis de escualeno en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y grafica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos	73

28	Grafica de barras de los valores encontrados en el análisis de tocoferoles en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y grafica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos	74
-----------	---	----

RESUMEN

El aprovechamiento de residuos industriales es una demanda prioritaria a nivel nacional e internacional, por cuestiones de sustentabilidad. Asimismo, la industria alimentaria debe asegurar la inocuidad de sus productos a través de controles de calidad en cuanto a los contaminantes que son de interés por su toxicidad, en especial los plaguicidas. A nivel local, la industria de extracción y refinación de aceite vegetal es una actividad económica importante. De la etapa de desodorización en el proceso de refinación se obtiene un subproducto denominado genéricamente ácidos grasos destilados (AGD's) potencialmente rico en fitoesteroles, tocoferoles y escualeno, que son sustancias bioactivas ya que producen efectos hipocolesterolémicos, antioxidantes y emolientes entre otros; por lo tanto se les considera útiles en la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas. Sin embargo, durante este paso también es posible extraer insecticidas organoclorados y organofosforados por ser liposolubles y de bajo punto de ebullición.

Con base en lo anterior el propósito de la presente investigación fue caracterizar los AGD's provenientes de la desodorización del aceite de soya (AGDAS), para su utilización como fuente potencial de fitoesteroles, tocoferoles y escualeno en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Además establecer los factores que pueden influenciar el contenido de dichos compuestos bioactivos, ya que hasta el momento se comercializa como subproductos de la refinación, sin embargo con base en los resultados de esta investigación pudieran llegar a alcanzar valores mucho más importantes que el aceite comestible mismo.

Para lo cual se cuantificó tanto la concentración de fitoesteroles, tocoferoles y escualeno, como la de los plaguicidas organoclorados y organofosforados en AGDAS de procedencia americana y nacional, grado de calidad premium y genérico y ciclos de cultivo bajo diferentes condiciones climáticas. Se establecieron metodologías de preparación y análisis de fitoesteroles, tocoferoles, escualeno y plaguicidas, que resultó una innovación viable en función de la disminución de costos, tiempo y residuos peligrosos, y se documentaron sus parámetros de validación. Adicionalmente, mediante un diseño estadístico multifactorial se estableció la influencia de los factores procedencia del grano, grado de calidad y condiciones de cultivo en la composición de los AGDAS, lo cual permite predecir rendimientos de los compuestos bioactivos objeto de este estudio.

Los resultados muestran que es factible el aprovechamiento AGDAS considerando su contenido de tocoferoles y fitoesteroles, ya que fue superior al 10%, no así para escualeno que resultó menor al 5%. La procedencia y condición de cultivo, son factores que influyen en el contenido de escualeno y tocoferoles en AGDAS con una concentración promedio de 1.75 y 13.12% p/p respectivamente. La procedencia, condición de cultivo y grado de calidad no son factores determinantes en el contenido de fitoesteroles totales con una concentración promedio de 14.92 %p/p. La proporción de fitoesteroles esterificados de 4.9 % p/p, está relacionada con el grado de calidad y condición de cultivo. La concentración de los plaguicidas analizados en AGDAS fueron inferiores a los límites de cuantificación del método utilizado (0.126-0.341 mg/kg).

ABSTRACT

The exploitation of industrial waste by meanings of sustainability is a priority demand in national and international levels; this is the reason that the substitution of artificial ingredients by natural products on food, supplements and drugs has gained a global attention on its production. In the same way, the food industry must ensure the safety of its products by quality controls watching for the contaminants that are important for their toxicity, specially the pesticides. In a local level, the extraction and refining industry of vegetal oil is an important economic activity. From the deodorization stage in the refining process, a sub product generically called Oil deodorizer distillates(ODD's) is obtained; it is potentially rich in phytoesterols, tocopherols and squalene, which are bioactive substances because they produce hypocholesterolemic, antioxidant and emollient effects, that is why they are considered very useful in the prevention of cardiovascular and degenerative diseases. Nevertheless, during this step it is also possible to extract organochlorine and organophosphorus pesticides for being liposolubles and with low boiling point. Based on the previous, the purpose of this research was to characterize the ODD's that came from the deodorization of soybean oil (SODD's) for its use as potential source of phytoesterols, tocopherols and squalene in food, pharmaceutical and cosmetic industries. Also to establish the factors that could influence in the content of the bioactive compounds because so far they are being commercialized as refining sub products, however due to these research results they could reach much more important values than the cooking oil itself. Phytoesterols, tocopherols and squalene concentrations were quantified as well as the concentration of organochlorine and organophosphorus pesticides in SODD's, with American and International origin, Premium quality range and growing under drought and normal conditions. Different preparation and analysis methodologies of phytoesterols, tocopherols and squalene that resulted in a viable innovation in function of decreasing costs time and dangerous wastes, were established as well as a documentation of its validation parameters. In addition, by a multifactorial statistic design, the influence of the origin factors of grain, quality range and growing conditions in the SODD's was established, this allows the prediction of the bioactive compounds performance.

Based on the results, it is established that the exploitation of SODD's due to its tocopherols and phytoesterols content is feasible, i.e. the exploitation was over 10%. This is not the case of squalene, which exploitation resulted in less than 5%. The origin, growing condition and quality range are factors that influence in the squalene and tocopherols content in AGDAS with an average concentration between 1.75 and 13.12% respectively. The origin, growing condition and quality range are not determinant factors in the content of total phytoesterols with an average concentration of 14.92% p/p. The esterified phytoesterols proportion is related with the grain quality, growing condition and not by the origin with a maximum value of 4.9% p/p. The concentration of all 19 analyzed pesticides in SODD's was found below quantification limits of the method that is in the range of 0.126-0.341 mg/kg.

1.0 INTRODUCCIÓN

Una demanda actual a nivel industrial es la disminución y/o aprovechamiento de los subproductos generados en los procesos. En la industria de extracción y refinación de aceite vegetal, la optimización de cada una de las etapas y la caracterización de los subproductos generados en las mismas son un tema de investigación (Costa *et al.*, 2011)

Durante el proceso de refinación, específicamente en la etapa de desodorización se genera un subproducto conocido como ácidos grasos destilados (AGD's) del cual existen reportes que indican su alto contenido de componente menores tales como fitoesteroles, tocoferoles y escualeno, sustancias biológicamente activas con alto valor en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Costa *et al.*, 2011) Sin embargo, por la condiciones bajo las cuales se realiza el proceso de desodorización, es posible que sean arrastrados a dicho subproducto plaguicidas organoclorados (POC) y organofosforados (POF).

A nivel local, la industria de extracción de aceite de semillas oleaginosas es una actividad económica importante. El aceite que se obtiene debe ser refinado para su uso comestible, este proceso consiste en una serie de etapas, entre ellas la desodorización, en la que se eliminan sustancias volátiles responsables de características organolépticas indeseables (color, olor, sabor). El producto residual obtenido (AGD's), contiene en su mayoría cetonas o aldehídos de peso molecular bajo y en ocasiones ácidos grasos libres de menos de 12 átomos de carbono, esteroles, escualeno y tocoferoles (Dumont *et al.*, 2007).

En base lo anterior, el propósito de la presente investigación fue el desarrollo de metodologías analíticas optimizadas y validadas que representen una opción viable a la industria alimentaria en cuanto a disminución de costos, tiempo y generación de residuos para la caracterización del subproducto denominado ácidos grasos destilados de aceite soya (AGDAS) provenientes de la industria de refinación, específicamente del proceso de desodorización, como fuente potencial de fitoesteroles, escualeno y tocoferoles, que son sustancias fisiológicamente activas como hipocolesterolémicos y antioxidantes naturales que juegan un papel muy importante en la nutrición de humanos y animales.

2.0 DEFINICION DEL PROBLEMA y JUSTIFICACIÓN

La industria aceitera ha mostrado interés en aprovechar directamente el valor de los AGDAS, por lo que se requiere caracterizar los componentes menores que le dan el valor económico como son los fitoesteroles, tocoferoles y escualeno y a la vez, documentar la presencia y concentración de plaguicidas mediante el uso de metodologías analíticas optimizadas y validadas que garanticen la calidad de los resultados con una reducción de tiempo, costos y generación de residuos. Por otra parte, es vital el conocimiento de la posible influencia de los factores que pueden incidir en la composición de los AGDAS, como la procedencia del grano, grado de calidad y condiciones de cultivo, ya que cuando se presentan variaciones climáticas la respuesta al estrés puede modificar la composición química de los productos de origen vegetal (Redden, 2013).

Por lo anterior se cuantificó en el subproducto, tanto la concentración de los compuestos bioactivos, como los plaguicidas organoclorados y organofosforados que pudieran ser arrastrados en el proceso de desodorización, y en consecuencia estimar su valor económico, ya que hasta el momento se comercializan como subproductos. Sin embargo, al conocer la concentración de sustancias bioactivas, permitirá ofrecerlo como un producto estandarizado para la industria de los nutracéuticos y alimentos fortificados, con mayor valor en el mercado que el subproducto no caracterizado, el cual es posible usarlo solo para enriquecer alimentos para ganado.

3.0 ANTECEDENTES

3.1. Oleaginosas

Las oleaginosas son plantas utilizadas para la producción de aceites y grasas comestibles. Su rasgo característico es el alto contenido de aceite, generalmente de 20% en peso o mayor (Willms *et al.*, 1999; Matthäus y Brül, 2001). La Tabla 1 muestra los contenidos de aceite de las semillas más utilizadas a nivel mundial.

Tabla 1. Contenido y producción de aceite de oleaginosas. Editada de Miyahara, 1993.

Oleaginosa	Contenido de aceite (%)
Canola	40 – 45
Maíz	3.1 - 5.7
Semilla de algodón	18 – 20
Cacahuate	45 – 50
Cártamo	30 – 35
Soya	18 – 20
Girasol	35 – 45

3.1.1 Soya

La soya es una planta herbácea que pertenece a la familia Fabaceae, cuyo nombre científico es *Glycine max* L., de la cual se aprovecha la semilla. En México representa el principal cultivo oleaginoso Financiera Rural (2013), siendo en 2011 el 38% de la superficie sembrada destinada a este grupo (167 mil de 439 mil ha), así como el 44.3% del volumen producido (205 mil de 463 mil toneladas) y el 37.3% del valor total de las oleaginosas (1289 de 3452 millones de pesos). Los principales consumidores de soya a nivel nacional son la industria aceitera y pecuaria. La industria aceitera utiliza la soya para la extracción y transformación de aceite, para uso comestible principalmente. Por otro lado, la industria pecuaria utiliza principalmente la pasta o harina de soya, la cual también es un subproducto de la extracción de aceite, por su alto nivel de proteínas (cerca del 40%) y bajo nivel de toxicidad (Dumont y Suresh, 2007). Estos usos han

permitido que la soya sea considerada como uno de los cultivos más rentables en el mundo (Financiera Rural, 2013).

3.2. Producción y refinación del aceite vegetal

Para obtener aceite comestible de las semillas de oleaginosas se requiere una serie de procesos. El primero es la separación o extracción del aceite de la semilla mediante extracción química o separación física. Después de varios procedimientos, pasa de aceite crudo a producto comestible (Figura 1).

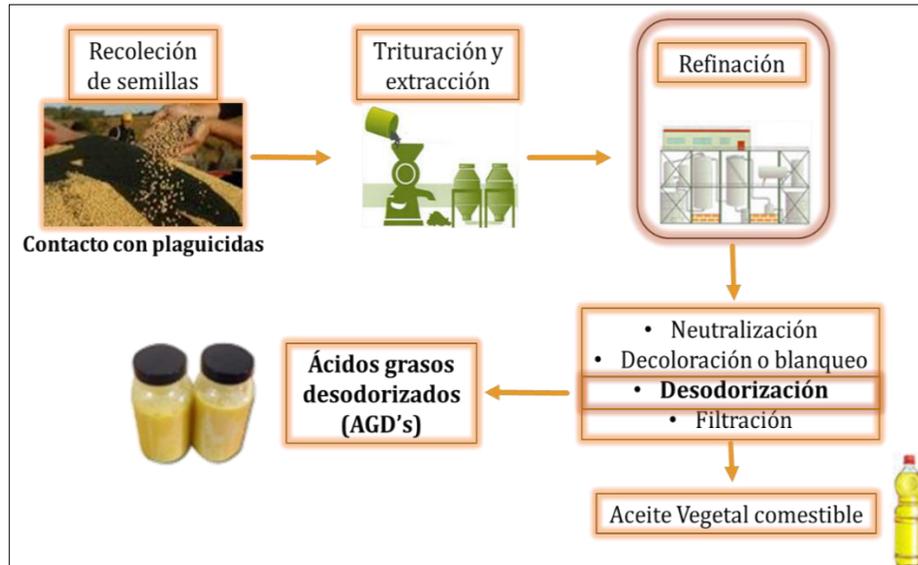


Figura 1. Esquema del proceso de producción y refinación del aceite vegetal.

Un factor importante durante todo el proceso es evitar la oxidación y la hidrólisis de los aceites, ya que afectan su calidad. La oxidación se origina por la exposición al oxígeno y puede ser acelerada con calor, esta provoca problemas de olor y estabilidad de sabor. La hidrólisis ocurre siempre que los aceites entren en contacto con agua generando ácidos grasos libres (O'Brien *et al.*, 2000).

El objetivo de la refinación del aceite es remover algunas sustancias presentes en el mismo, para así satisfacer los estándares de calidad en sabor, apariencia y estabilidad. Los procesos unitarios asociados usualmente son el desgomado, blanqueado y deodorizado. Las gomas (fosfolípidos) y los complejos metálicos se remueven en el desgomado y los productos de oxidación y pigmentos son eliminados durante el blanqueamiento, proceso que también remueve cualquier traza de gomas y jabones (Wiedermann, 1981). Finalmente, es necesario un proceso de desodorización, que consiste en una destilación por arrastre de vapor. El vapor se inyecta al aceite a baja presión (1 a 6 mm Hg) y a una temperatura de 252 a 266 °C para destilar los ácidos grasos libres y los compuestos causantes de mal olor (Erickson, 1995).

La desodorización de los aceites vegetales tiene la finalidad de eliminar sustancias que imparten sabores y olores indeseables a los mismos. Esta operación es una de las etapas finales en el proceso de refinación de aceites vegetales utilizado actualmente y se lleva a cabo por destilación, mediante arrastre con vapor, de las sustancias más volátiles presentes en el aceite extraído. Junto con las sustancias que producen aromas indeseables al aceite (productos de oxidación como aldehídos, cetonas, etc.) se destilan en parte, otros componentes minoritarios del aceite, tales como ácidos grasos libres, tocoferoles, esteroides, escualeno, mono y diglicéridos, algo de triglicéridos, hidrocarburos pesados y otros componentes menores. Este subproducto se denomina Ácidos grasos destilados (AGD's) y las condiciones de desodorización (temperatura, presión, tiempo de residencia), influyen en su composición (O'Brien *et al.*, 2000). Este subproducto, normalmente se mezcla con otros efluentes del proceso de refinación y de esta manera se comercializa con un bajo valor a otras industrias relacionadas. Sin embargo, las características de algunos de los componentes presentes sugieren la conveniencia de un tratamiento que permita separar los compuestos de mayor valor. En algunas industrias de refinación de aceites, este destilado se vende a empresas que recuperan algunos de sus componentes. El precio de este destilado se basa generalmente en su contenido de tocoferoles, aunque en ocasiones también el contenido de esteroides ha sido considerado (Pramparo, 2005).

3.3 Compuestos de Estudio

3.3.1 Fitoesteroles

Los esteroides y estanoles vegetales (a los que se refiere colectivamente como fitoesteroides) son constituyentes normales de la dieta humana (Figura 2). Los fitoesteroides y sus formas reducidas, son esteroides de origen vegetal ampliamente distribuidos en la naturaleza y cuya estructura es muy similar a la del colesterol. Dichos compuestos como el campesterol, el β -sitosterol y el estigmasterol están ampliamente distribuidos en las plantas en cantidades variables (Hovenkamp *et al.*, 2008).

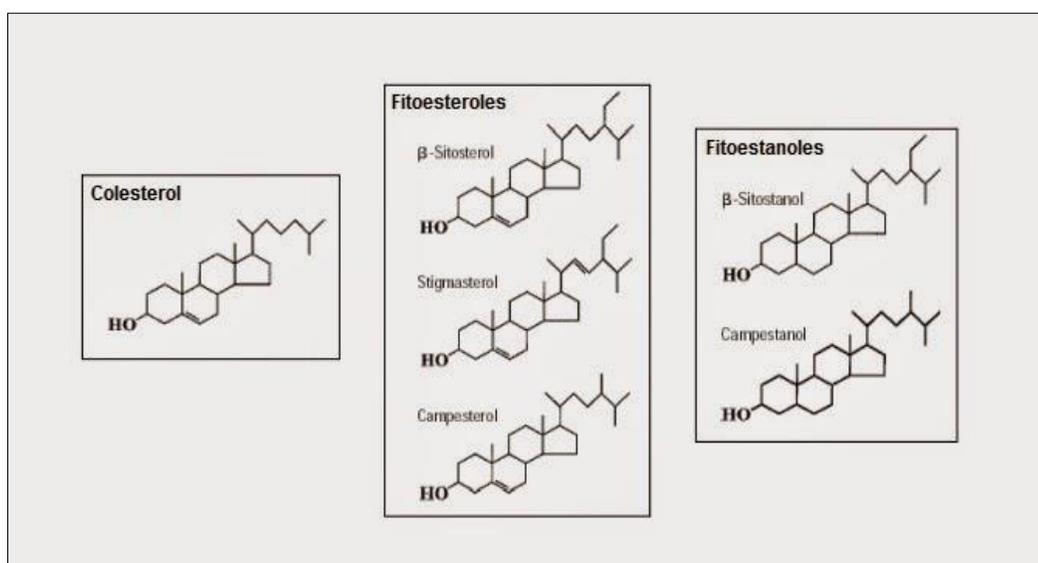


Figura 2. Estructura química de Fitoesteroides

El promedio de ingesta diaria de fitoesteroides en los países occidentales es aproximadamente de 250 mg/día, principalmente provenientes de aceites vegetales, cereales, frutos secos, etc. Estos son componentes bioactivos menores de los lípidos, es decir, tienen un efecto positivo en la salud humana. Los aceites vegetales contienen solo 0.1-1% de fitoesteroides. Se ha reportado, que dosis de 3.1 g de fitoesteroides por día podrían proporcionar beneficios para la salud. Lo anterior, indica que se requieren fitoesteroides en una forma concentrada y de calidad alimentaria, lo que ha generado un interés creciente en la preparación de alimentos enriquecidos con fitoesteroides para su uso como nutraceutico (Meijer, 1999; Daguat, 2000; Ling y Jones, 1995).

Desde hace años se conoce que los fitosteroles producen efectos hipocolesterolémicos cuando son ingeridos en el rango de 1-3 g/día, por lo cual se les considera como importantes aliados en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, siendo su consumo indicado para individuos con hipercolesterolemias leves o moderadas (Gonzalez *et al.*, 2012). El efecto hipocolesterolémico es atribuido a tres acciones metabólicas: a) inhibición de la absorción intestinal de colesterol, por competencia durante la incorporación a las micelas mixtas; b) disminución de la esterificación del colesterol en los enterocitos, al inhibir la actividad de la enzima acilCoA-colesterol-acil transferasa; c) estimulación del eflujo de colesterol desde los enterocitos hacia el lumen intestinal, al aumentar la actividad y la expresión de un transportador de tipo ABC. La acción conjunta de los esteroides y/o estanoles sobre estos mecanismos produce una disminución del colesterol total plasmático y del colesterol-LDL, sin modificar los niveles del colesterol-HDL. Los fitoesteroides y fitoestanoles constituyen un modelo muy adecuado para el desarrollo de alimentos funcionales (Valenzuela y Ronco, 2004).

Los esteroides en plantas existen como fitoesteroides libres, ésteres de ácido graso y en formas glicosilada y acilada esteril glicosilada. En aceites comestibles los fitoesteroides están presentes en su forma libre y esterificada (Fernandes y Cabral, 2006).

Texeira *et al.* (2011), en un estudio de la producción de ésteres de fitoesteroides a partir de AGDAS, resaltan que los fitoesteroides esterificados tienen mayor interés en la industria alimentaria por ser más bioactivos y liposolubles que los fitoesteroides libres, por lo que es fácil incorporarlos en productos grasos para la producción de alimentos funcionales.

Existen diversos reportes que promueven los fitoesteroides para alimentos funcionales o saludables por su actividad antioxidante y estabilidad térmica. Por ello, su uso en

diferentes productos alimenticios como yogur, zumos de frutas, bebidas y también los aceites de cocina (Wang *et al.*, 2002; Watkins, 2005). El aceite de cocina rico en fitoesteroles puede ser utilizado para producir frituras, pasteles, panes y de esta manera bajar el colesterol en los consumidores (Kochhar, 2000). En el mercado mundial, estos productos están siendo comercializados a los restaurantes y empresas de servicios alimentarios que están buscando más formas de controlar el colesterol sin el uso de drogas (Makhal *et al.*, 2006).

La refinación química del aceite vegetal es el proceso más usado para la reducción de sustancias responsables de olores indeseables, y del mismo se extrae una cantidad significativa de productos indeseables (gomas y ácidos grasos destilados). El subproducto generado en el proceso es una fuente de componentes valiosos, como los ácidos grasos libres, monoacilgliceroles (MAG), diacilglicerol (DAG), triglicéridos (CTC), esteroles y tocoferoles. La extracción de estos componentes de los destilados de desodorización y su conversión en productos de valor ha sido objeto de varias investigaciones (Haas *et al.*, 1996, 2000 y 2003).

Existen diferentes estudios que reportan concentraciones variables de fitoesteroles en AGDAS, estos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Referencias que reportan diferentes concentraciones de fitoesteroles en AGDAS.

REFERENCIA	% p/p de Fitoesteroles en AGDAS
Dumont & Suresh, 2007	7.1
Khatoon <i>et al.</i> , 2009	6.1-7.8
Verleyen <i>et al.</i> , 2001	15.26
Ito <i>et al.</i> , 2005	20

3.3.2 Escualeno

El escualeno, es un isoprenoide de 30 carbonos presente en la fracción lipídica insaponificable de algunos alimentos , y es abundante en el aceite de hígado de tiburón

(*Squalus spp.*) y el aceite de oliva (Figura 3). Algunos estudios han indicado que el escualeno es un importante agente quimiopreventivo del cáncer (Smith, 2000). Más recientemente, se ha demostrado que este compuesto actúa como un antídoto para reducir toxicidad inducida por drogas, lo que puede ser atribuido a su función como un antioxidante (Aguilera *et al.*, 2005 y Senthilkumar *et al.*, 2006).

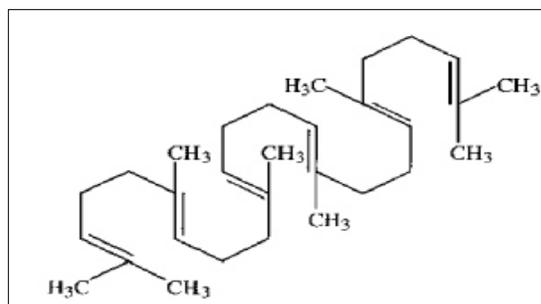


Figura 3. Estructura química del escualeno.

El escualeno es un terpenoide costoso que se extrae principalmente a partir del aceite de hígado de tiburón, aunque este hidrocarburo también se encuentra en pequeñas cantidades en la fracción insaponificable de los aceites vegetales como los obtenidos a partir de aceitunas y el amaranto (He y Corke, 2003). Su importancia como suplemento dietético está ligada a la capacidad de reducir los niveles de colesterol y triglicéridos (Chan *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002).

Por otra parte, el escualeno también se utiliza en su forma natural o hidrogenada en la formulación de cosméticos por sus propiedades como humectante o agente emoliente. Sin embargo, su uso en aplicaciones cosméticas ha sido limitado ya que existe una preocupación por la conservación de las especies marinas a nivel internacional, por lo que resulta importante establecer fuentes alternas para el suministro de este hidrocarburo. Pramparo (2005) reporta niveles de escualeno en AGDAS de 1.19 % p/p, mientras que Dumont y Suresh (2007) y Guanawn *et al.* (2007) establecen contenidos de

5.5 y 1.83 % p/p respectivamente, por otro lado Verleyen *et al.* (2001) encuentran concentraciones de 0.9 % p/p.

3.3.3 Tocoferoles

Los Tocoferoles son compuestos con actividad de vitamina E, importantes en la protección de los lípidos insaturados de las membranas celulares contra la oxidación (Benites *et al.*, 2005). La vitamina E considera ocho variantes diferentes: α -, β -, γ -, y δ -tocoferoles cola fitilo saturado (Figura 4) y α -, β -, γ - y δ -tocotrienoles (cola fitilo insaturado). En estudios de prevención del cáncer con vitamina E se ha utilizado principalmente la variante α -tocoferol (Constantinou, 2008).

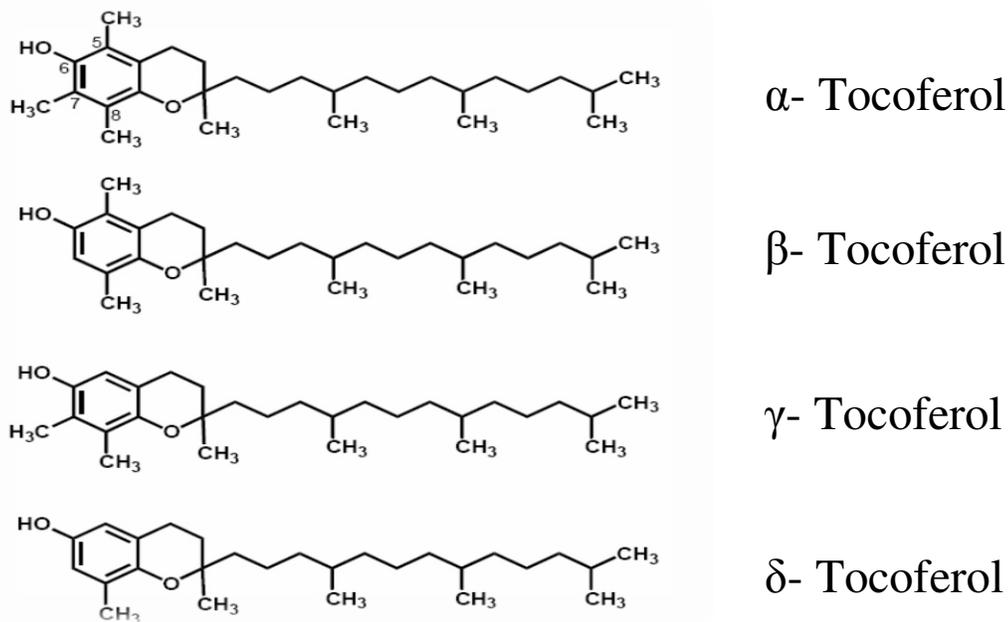


Figura 4. Estructura química de α -, β -, γ -, y δ -tocoferoles. Editado de Smolarek y Nanjoo, 2011.

El γ -tocoferol y más recientemente δ -tocoferol, han mostrado una mayor capacidad para reducir la inflamación, la proliferación celular, y la carga tumoral. Asimismo, mezclas

enriquecidas con γ , β -y δ -tocoferoles inhiben el desarrollo de la hiperplasia mamaria y la tumorigénesis en modelos animales (Lee *et al.*, 2009).

Smolarek y Nanjoo (2011) realizaron una revisión de la actividad quimiopreventiva de la vitamina E para cáncer mamario y concluyeron que los resultados de estudios en donde se expresan los tocoferoles de forma genérica como vitamina E, pueden ser vagos si no se define la variante de tocoferol utilizado. Igualmente, establecen que dicha distinción es muy importante para determinar la eficacia de cada variante tocoferol y su actividad como quimiopreventivo, por lo que existen realmente pocos estudios en los que si se especifica ésta,.

El α -tocoferol es conocido como la "clásica" vitamina E, se encuentra más comúnmente en germen de trigo, almendras y aceite de girasol. Sin embargo, el γ -tocoferol es más común que el α -tocoferol en la dieta estadounidense y se encuentra en aceites vegetales como el de soya, maíz y algodón y en los subproductos del aceite de maíz (Traber, 2007).

Benites *et al.* (2005) reportaron un contenido de tocoferoles totales de 10.44% p/p, en un estudio para evaluar el contenido de estos compuestos después de una etapa de neutralización de los AGDAS para su uso potencial como un suplemento en la alimentación de animales.

Químicamente, los AGD's son una mezcla compleja de ácidos grasos libres, triglicéridos, cetonas, peróxidos, hidrocarburos, oleínas, esteroides y tocoferoles (Okoshi *et al.*, 2007) y se han usado en la industria alimentaria y farmacéutica como fuente de antioxidantes naturales (De Greyt y Kellens, 2000).

Moraes *et al.* (2004) demostraron que la vitamina E, presente en AGD's, fue eficaz en la protección contra la oxidación de los lípidos en hígado de ratas y no mostró ninguna toxicidad para los animales. Sin embargo, los resultados de la oxidación de lípidos fueron superiores a los obtenidos con la suplementación de vitamina E sintética. Por lo tanto, dada la importancia de tocoferoles y que el uso de AGD's en forma cruda, no resulta tóxico, lo recomiendan como una fuente viable de un suplemento de vitamina E.

El incremento del uso de los desechos y subproductos industriales es una necesidad de la industria para cumplir con las normas ambientales, además, la sustitución de ingredientes artificiales por productos naturales ha ganado la atención mundial en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. El uso del AGD's como un nutriente en la dieta de animales rumiantes como fuente de tocoferoles, también está reportado. Por lo que, además del aspecto económico, investigaciones con este producto han ido en aumento, en busca de métodos para su empleo (Borher *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2004), y el estudio de posibles efectos tóxicos del mismo (Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006).

Varios autores han estudiado los tocoferoles (vitamina E) presentes en los AGD's. La evaluación de la cantidad de cada tipo de componentes presentes en estos residuos es realmente importante para una buena estimación de su conveniencia económica (Martis *et al.*, 2006b; Mendes *et al.*, 2005 y 2002; Nagao *et al.*, 2005 y Waranabe *et al.*, 2004).

Brasil es el segundo mayor productor de soya y por lo tanto tiene una gran cantidad de subproducto, viable para la recuperación de tocoferoles (Martins *et al.*, 2006a).

Existen diferentes estudios que reportan concentraciones variables de tocoferoles en AGDAS, estos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Referencias que reportan diferentes concentraciones de tocoferoles en AGDAS.

REFERENCIA	% p/p de tocoferoles en AGDAS
Ito <i>et al.</i> , 2005	10.0
Benites <i>et al.</i> , 2005	10.44
Verleyen <i>et al.</i> , 2001	14.9
Dumont & Suresh, 2007	18.6

3.3.4 Plaguicidas

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias, también llamados pesticidas, pueden ser de origen natural o sintético y son agentes usados para eliminar plantas indeseadas o plagas de insectos que causan perjuicio o que interfieren en la producción, elaboración distribución y almacenamiento de alimentos, productos agrícolas, etc., (Lehotay *et al.*, 2005). El término de plaguicida incluye diferentes tipos de sustancias, las reguladoras para el crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, para reducir la densidad de la fruta, para evitar la caída prematura de la fruta y para proteger el producto contra el deterioro. El uso de éstos se ha incrementado en la población económicamente activa del sector agrario, lo que ha producido más de 25 millones de casos de intoxicaciones agudas (IAP) por exposición laboral, según estimaciones anuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS),. Para los países de América Latina, se estiman de mil a dos mil intoxicaciones anuales (Chamkasem, *et al.*, 2013). Los plaguicidas se pueden clasificar de diferentes maneras de acuerdo a sus características como lo son la toxicidad, su vida media y estructura química.

La tecnología de plaguicidas ha permitido incrementar la productividad de las tierras de cultivo desde la década de 1950. Económicamente, el uso de estos trae numerosos beneficios a la sociedad, menores costos de producción y rendimientos más altos atraen a los productores (Kirchman *et al.*, 2007).

3.3.4.1 Plaguicidas Organoclorados (POC)

Los POC son los más utilizados, su estructura química corresponde a la de los hidrocarburos clorados, lo que les confiere tanto una estabilidad física, como química y favorecen su persistencia en el ambiente y su lenta biodegradabilidad. Son insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Dentro de esta clasificación se incluyen varios grupos como el grupo Endosulfán y el Endrin (Figura 5).

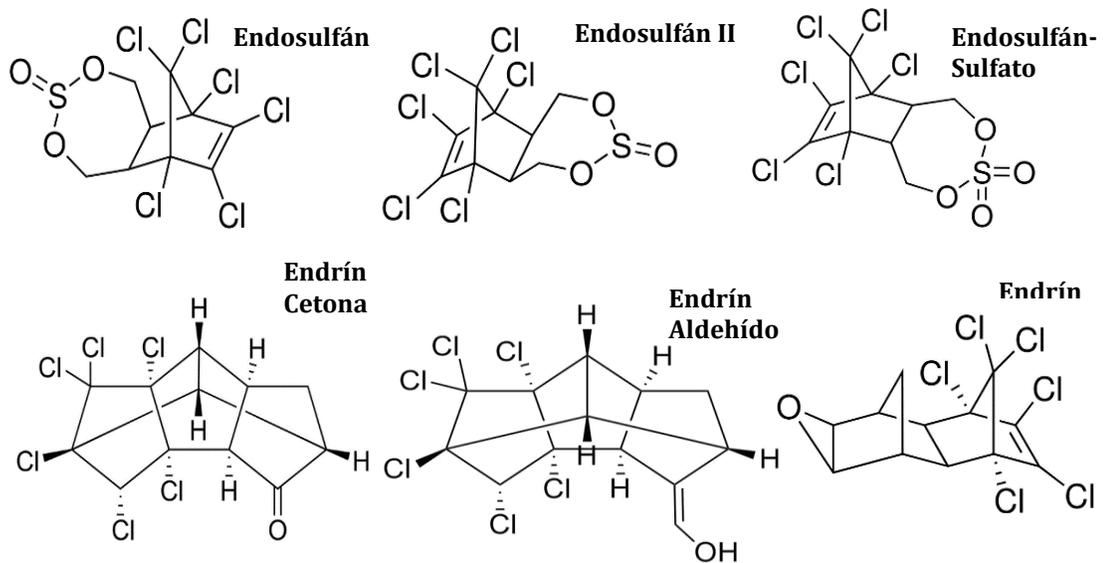


Figura 5. Ejemplos de plaguicidas Organoclorados (Ramírez, 2001).

3.3.4.2 Plaguicidas Organofosforados (POF)

Los POF, que son ésteres, amidas o tioles, derivados del ácido fosfórico, fosfónico y fosfortoico, conformadas por un átomo de fósforo unido a cuatro átomos de oxígeno, o en algunas sustancias, a tres de oxígeno y una de azufre. Por lo general, una de las uniones fósforo oxígeno es muy débil lo que favorece su descomposición y degradación por oxidación e hidrólisis, lo que da origen a productos solubles en agua, lo que los hace poco acumulables en el organismo humano y poco persistentes en el ambiente (Figura 6).

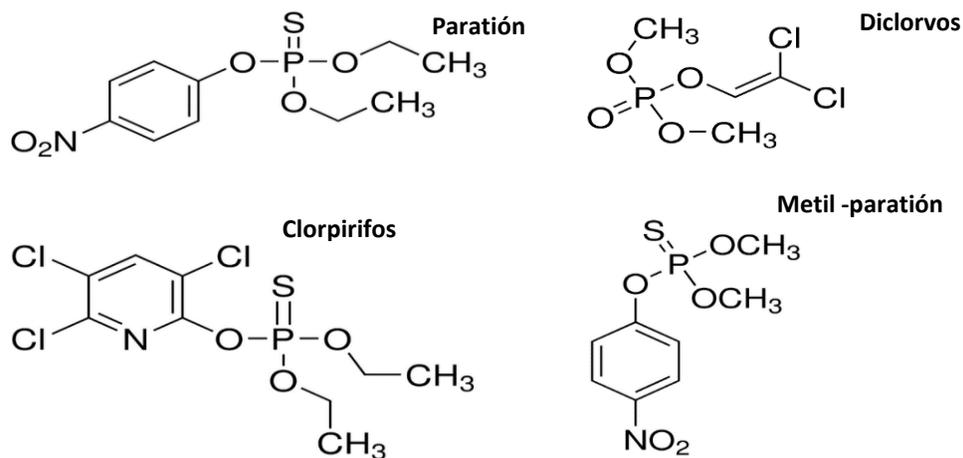


Figura 6. Ejemplos de plaguicidas Organofosforados (Ramírez, 2001).

En las últimas dos décadas, numerosos investigadores han venido denunciando la problemática que existe por el uso masivo y mal manejo de plaguicidas en el campo mexicano, así como la contaminación del agua, suelo y en especial de los alimentos. Dependiendo de las circunstancias, el contacto con plaguicidas puede dañar a la población humana. Por ejemplo, si el contacto es con dosis altas, puede producir hasta la muerte; pero dosis bajas con largos períodos de contacto o exposición pueden provocar enfermedades como algunos tipos de cáncer u otras poco conocidas y por lo tanto, difíciles de diagnosticar (Villa, 2004).

El número de personas que mueren por exposición directa a los plaguicidas es bajo; sin embargo, la mayoría de los plaguicidas no muestran un efecto inmediato, ya que su

toxicidad queda latente y actúa paulatinamente. Decenas de miles de personas se envenenan con ellos todos los años padeciendo síntomas más o menos graves. La mayoría son agricultores u otras personas que trabajan con éstas sustancias (Jimeno, 2008; López y Gallardo, 2001). Villa (2004), menciona que la mitad de los envenenamientos y el 90% de las muertes en el mundo relacionado con plaguicidas, ocurren en los países en desarrollo. Los principales factores son: etiquetas inadecuadas, analfabetismo, nula asistencia técnica y vigilancia; así como el uso indiscriminado y la mala asistencia médica.

Actualmente la población humana se encuentra expuesta diariamente al contacto y a la ingestión de pequeñísimas cantidades de plaguicidas, localizados en los alimentos y directamente en el ambiente. Algunos autores sugieren que las consecuencias para la humanidad a largo plazo, pueden ser serias. Se mencionan problemas como la disminución de la fertilidad, aumento de tipos de cáncer, malformaciones congénitas, diversos tipos de alergias, mutaciones genotípicas, problemas graves en el sistema nervioso central, desórdenes del sistema inmunológico, entre otros (Baldi *et al.*, 2003; Douwes, *et al.*, 2003; Mills y Yang, 2003; Shaw, *et al.*, 2003; Loffredo, *et al.*, 2001).

El consumidor actual generalmente relaciona la calidad de los alimentos con su apariencia, sin embargo, esta percepción no es suficiente (Guan *et al.*, 2009). Por lo cual, la industria alimentaria debe asegurar la inocuidad de sus productos a través de controles de calidad. Además, éstos deben examinar los insumos del proceso y las materias primas, así como conseguir el producto al menor costo posible con el mínimo de rechazos. Es por esto que las empresas deben ir un paso más allá para mantener una ventaja competitiva y certificar la seguridad de sus productos. En cuanto a seguridad alimenticia, los contaminantes son de gran interés, debido a la actual divulgación de información acerca de su toxicidad. Entre éstos destacan los agroquímicos, en especial los plaguicidas. Sin embargo, su análisis es complicado debido a que generalmente se encuentran a nivel de trazas. Por lo tanto es necesario desarrollar metodologías rápidas y baratas que puedan ser aplicables a la industria (Garrido *et al.*, 2007).

Existen diversas investigaciones sobre la presencia de plaguicidas en oleaginosas y su eliminación a través de la cadena del proceso de aceite comestible. Numerosos estudios han detectado POC en semillas de soya (Smith *et al.*, 1968; Chaudry *et al.*, 1976; Chaudry *et al.*, 1978) como POF (Miyahara y Saito, 1993). En dichos análisis se compara la concentración de plaguicidas en la semilla y en el aceite refinado conforme avanza el procesamiento, encontrando que la desodorización es muy efectiva en la remoción de estos contaminantes, probablemente debido a la combinación de descomposición y volatilización. Este último paso asegura que el producto final esté libre de plaguicidas. Miyahara y Saito (1993) demostraron la eliminación por tratamiento térmico análogo a la desodorización de cuatro POF con respecto al tiempo de calentamiento a 200 °C (Figura 7). En este caso las concentraciones se monitorearon con cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. Como se puede observar, el tratamiento térmico por sí mismo no es capaz de eliminar todos los plaguicidas, sino que es necesaria la combinación de calor, con vapor y vacío.

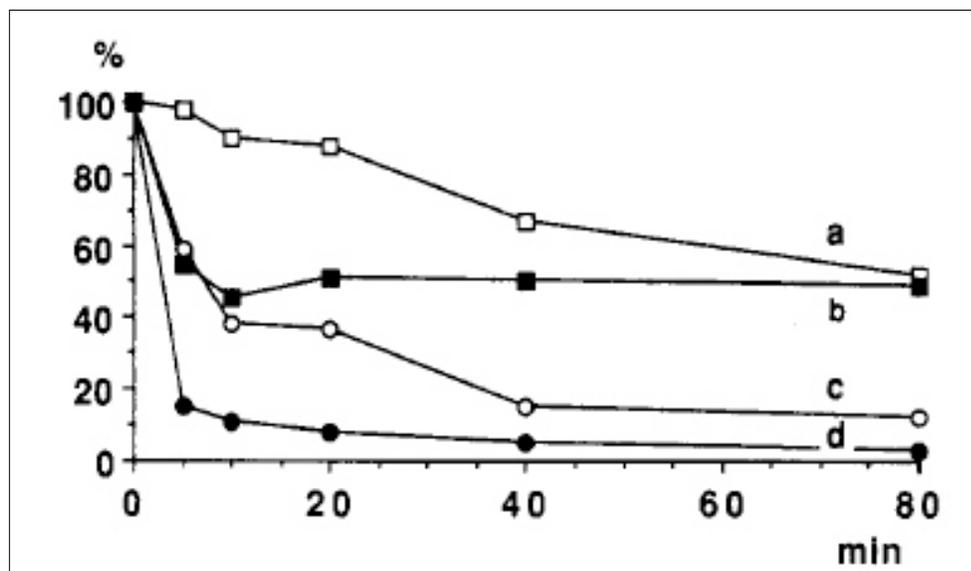


Figura 7. Desaparición de plaguicidas por tratamiento térmico: (a) malatión; (b) clorpirifos; (c) diclorvos; (d) captano. (Miyahara y Saito, 1993).

En el mismo estudio se analizó la variación de la cantidad de plaguicidas en distintas etapas de procesamiento de aceite de soya, encontrando que aunque la materia prima de inicio esté contaminada, la cantidad de plaguicidas va disminuyendo en cada etapa subsecuente del proceso y se comprueba que el producto final (aceite refinado) se encuentra libre de contaminantes (Tabla 4).

Tabla 4. Retención teórica de plaguicidas a cada etapa de procesamiento del grano de soya (Miyahara y Saito, 1993).

Muestra	Diclorvos, %	Malatión, %	Clorpirifos, %	Captano, %
Grano	100	100	100	100
Grano seco	10.4	93.4	98.2	15.0
Aceite crudo	11.6	80.8	80.8	12.3
Aceite (refinación cáustica)	0.153	7.34	55.9	11.46
Aceite blanqueado	0.0058	3.73	43.1	10.6
Aceite deodorizado	0	0	0	0

La inocuidad del aceite está asegurada en términos de plaguicidas por efecto de proceso de refinación, ya que como se observa en la Figura 8, el nivel de éstos en el aceite refinado está por debajo del límite máximo de plaguicidas residuales (LMR). En consecuencia, el deodorizado (AGD`s) es el destino final de los plaguicidas en caso de que la semilla los haya contenido en niveles por encima de dicho límite (Duijn, 2008).

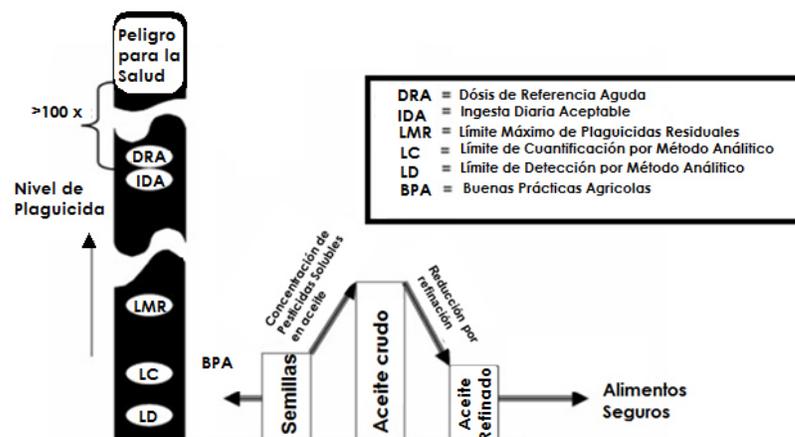


Figura 8. Cambios en los niveles de plaguicidas durante el proceso de extracción y refinación de aceite vegetal (Duijn, 2008).

3.4 Normas para el control de plaguicidas

Considerando la toxicidad aguda y crónica ya reconocida de los plaguicidas, las cantidades crecientes que se utilizan, su amplia disponibilidad y las condiciones precarias de su aplicación, existen normas para el control de estas sustancias, para garantizar la protección a la salud humana y al medio ambiente. En la actualidad la mayoría de los países, regulan la cantidad de residuos plaguicidas permitidos en un cultivo determinado, ésta puede variar de un país a otro. En Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA) es la encargada de regular estos residuos (National Pesticide Information, 2014). En México, la autoridad que regula el uso de estos compuestos es la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (Cicoplafest) creada a través del decreto publicado en el Diario Oficial de la federación (DOF) el 15 de octubre de 1987.

EPA es responsable de la regulación de los plaguicidas que utilizan los agricultores para proteger los cultivos, y para fijar los límites de la cantidad de plaguicidas que pueden permanecer dentro o sobre los alimentos comercializados en los Estados Unidos. Tales límites se denominan “tolerancias” (en muchos otros países se hace referencia a las tolerancias como a los límites máximos residuales o LMR, por sus siglas en inglés). Los plaguicidas usualmente se clasifican de acuerdo al tipo de plaga que controlan, sin embargo resulta más conveniente distinguirlos por sus estructuras químicas, ya que diferentes grupos de plaguicidas actúan de diversas maneras. Los grupos de plaguicidas sintéticos más comunes son los organofosforados, los carbamatos, los piretroides y los organoclorados (USEPA 2012).

Desde la prohibición del uso de los POC, los plaguicidas organofosforados (POF) son los insecticidas más usados. Actualmente hay más de 40 POF registrados para su uso. Todos éstos actúan a través de la inhibición de la acetilcolinoesterasa, resultando en la

inhibición de transmisiones nerviosas por parte del neurotransmisor acetilcolina (Vogel *et al.*, 2002; Weill *et al.*, 2002).

México ocupa el lugar número seis en el mundo en el uso de Diclorodifeniltricloroetano (DDT) y se estima que aproximadamente 250 kt han sido usadas entre los años de 1947 y el 2000 (Ruiz *et al.*, 2008).

En la Tabla 5, se enlistan algunos de los plaguicidas de interés para este estudio y la regulación que tienen en diferentes organismos como la Agencia de Protección Ambiental en E.U, la Unión Europea y la Red de Agricultura Sostenible que engloba a América Latina.

Tabla 5. Plaguicidas prohibidos en diferentes organismos a nivel mundial.

Ingrediente Activo	EPA	Unión Europea	RAS
Aldrín	X	X	X
Clordano	X	X	X
DDT	X	X	X
Dieldrín	X	X	X
Endosulfán	X	X	X
Endrín	X	X	X
Heptacloro	X	X	X
Hexaclorobenceno	X	X	X
Lindano (g-HCH)	X	X	X
Metil Paratión	X	X	X
Paratión	X	X	X

Red de Agricultura Sostenible-Lista de Plaguicidas Prohibidos
https://www.imaflora.org/downloads/biblioteca/RAS_Lista_de_Plaguicidas_Prohibidos_Noviembre_2011.pdf (accedido Mayo 18, 2014).

3.5 Consideraciones metodológicas

3.5.1 Fitoesteroides y escualeno

Con respecto a los métodos para el análisis de Fitoesteroides por cromatografía de gases, existe información que cita la etapa previa de derivatización, específicamente la

sililación, la cual consiste del remplazo de un hidrógeno ácido por un alquilsililo dentro de una molécula, con lo cual se mejora la volatilidad, estabilidad térmica y la detección del analito. Sin embargo, para esta etapa se utilizan reactivos como la piridina y N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida con 1 % de trimetil cloro silano (TMCS), los cuales son de difícil manejo en el laboratorio y representan un costo extra para su correcta disposición. La derivatización tiene también la desventaja de que las condiciones y los tiempos de reacción llegan a ser hasta de 2 h (Lin *et al.*, 2008). Por todo lo anterior, resulta importante evaluar estadísticamente la posibilidad de eliminar la etapa previa de derivatización para el análisis de los compuestos de interés.

Durant *et al.* (2006), emplearon un método de derivatización por silanización para analizar los Fitoesteroles libres (FL), esterificados (FE) y totales (FT) en AGD's de aceite canola por la técnica de cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS) con una columna medianamente polar.

Otros autores, reportan el uso de un sistema en línea; Cromatografía de líquidos-Cromatografía de gases (CL-CG) para el análisis de FL, FE y FT. En el cromatógrafo de líquidos los FL se separan de los triglicéridos para su posterior identificación y cuantificación en el Cromatógrafo de gases (CG). Para la determinación de los FT, las muestras son saponificadas y los insaponificables, se extraen con éter etílico y se inyecta al sistema CL-CG, mientras que los FE se estiman de forma indirecta (Toledano *et al.*, 2012). Esta técnica genera una alta cantidad de residuos y es de alto costo por involucrar las dos técnicas analíticas cromatográficas.

Por otra parte, por ser los AGDAS una matriz compleja (concentrado de ácidos grasos libres, diglicéridos y triglicéridos), resulta indispensable también, establecer protocolos de purificación previa a la cuantificación para la eficiente separación de los FL de los FE, además de la eliminación de algunas interferencias. Existen reportes que refieren el uso de 15 g sílica gel como adsorbente empacado en columnas de vidrio (300 x 20mm) y

75 mL de eluente fracción polar para la elución de los FL y otros 75 mL de fracción no polar, para la elución de los FE, para cada muestra (Verleyen *et al.*, 2002). Este procedimiento requiere cantidades importantes de reactivos y genera una dificultad para el correcto manejo y disposición de los residuos, aunado a la complejidad en la manipulación del material de vidrio utilizado en la purificación. Otros estudios utilizan 500 mL de una mezcla de metanol: cloroformo (1:2 v/v) para la extracción y purificación de los FL y FE en semillas (Breinhölder *et al.*, 2002). En este caso, el cloroformo por ser un organoclorado, es un solvente de difícil manejo en el laboratorio, potencialmente tóxico, además de que se generan costos extra para su correcta disposición.

3.5.2 Tocoferoles

En cuanto a los métodos de análisis de tocoferoles en matrices de oleosas, la técnica analítica más referenciada es la de cromatografía de líquidos (De Greyt *et al.*, 1998). En un estudio de tocoferoles en AGDAS por la misma técnica, Fang *et al.* (2007) utilizaron columnas de fase polar para la cuantificación, mientras que, Jiang *et al.* (2006) utilizaron columnas fase reversa para esta misma matriz. Dicha técnica resulta ser más costosa, menos robusta y genera grandes volúmenes de solventes, lo cual representa un costo extra para su disposición. Una alternativa analítica, es la cromatografía de gases con etapas previas de saponificación y derivatización (Verleyen *et al.*, 2002; Durant *et al.*, 2006). Sin embargo, representa importantes inversiones de tiempo y costo además de que también genera residuos tóxicos. Por otra parte, Saba *et al.* (2012) utilizaron cromatografía de gases con estándar interno y previa saponificación para el análisis de tocoferoles en AGDAS.

En el método AOCS, Ce 3-74 (2009), se describe el procedimiento para el análisis de tocoferoles y esteroides en el aceite destilado proveniente de la desodorización. En ésta, se menciona que la muestra es saponificada, se extrae el material insaponificable y se

hace reaccionar con el anhídrido butírico, los éster butirato de los tocoferoles y esteroides son analizados por cromatografía de gases con un detector de ionización de flama.

Torres-González *et al.* (2009) analizaron los tocoferoles en aceite de coco crudo y del proveniente de las diferentes etapas de la refinación utilizando la técnica de HPLC-UV a 292 nm, con la fase móvil de hexano:isopropanol (99.5/0.5). Dos gramos de muestra fueron disueltas en 25 mL de hexano para posteriormente inyectarlas directamente al HPLC.

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos, esteroides y tocoferoles en AGD's de aceite de soya y linaza fue exitosamente lograda mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (Dumond y Surech, 2007). Estos autores refieren que es necesaria la derivatización por silanización de las muestras antes de su inyección en una columna no polar, lo cual permite obtener picos cromatográficos con resolución aceptada de los diferentes componentes, lo que llevó a la identificación inequívoca de la mayoría de los componentes de las muestras.

Caligiani *et al.* (2010), realizaron el análisis de la fracción insaponificable del aceite de semillas de *Punica granatum* con el fin de evaluar su potencial como alimento funcional. Determinaciones cualitativas y cuantitativas de tocoferol, escualeno, fitosteroides y policosanoles GC-MS. Se obtuvo un alto rendimiento de materia insaponificable en el rango de 3.01 a 4.02 %, niveles significativos de escualeno de hasta 800 mg/kg y el policosanol de 118-185 mg/kg. El β -sitosterol en el orden de hasta 8069 mg/kg, mientras que los β - y δ -tocopheroles fueron las formas más abundantes de vitamina E. De los resultados obtenidos, puede sugerirse que el aceite de semilla de *P. granatum* puede ser considerada una fuente interesante de sustancias alimenticias con valor nutracéutico implicado en la modulación del colesterol metabolismo.

3.5.3 Plaguicidas

A pesar de que se ha reportado el análisis de plaguicidas en AGDAS desde la década de los sesenta (Smith *et al.*, 1968) estos han sido más enfocados a la investigación científica que a la implementación a nivel industrial. Es decir, dichos estudios reportan metodologías costosas y tardadas en el sentido de utilizar numerosos solventes para extraer la fracción de interés mediante columnas cromatográficas, lo que a su vez requiere de reactivos en grandes cantidades (Smith *et al.*, 1968; Chaudry *et al.*, 1976; Chaudry *et al.*, 1978; Miyahara y Saito, 1993). Otro de los inconvenientes es la utilización de varios detectores en el cromatógrafo de gases si se requiere cuantificar distintos tipos de plaguicidas, como organoclorados y organofosforados (Firestone, 2009; Amvrazi y Albanis, 2006) lo que también aumenta el costo del análisis.

En cuanto a la preparación de la muestra, la mayoría de los autores consideran la extracción y purificación como las etapas más críticas del análisis, ya que de ellas depende el conseguir las fracciones adecuadas para el análisis posterior. En las matrices ricas en grasas, la extracción completa de los residuos lipofílicos, como es el caso de los POC y POF, sólo se asegura cuando se extrae toda la grasa de la muestra, por lo que la elección del método más adecuado está condicionada por el tipo de muestra y los analitos a investigar (Kodba y Voncina, 2007). Lo ideal es que un método de extracción sea rápido, simple y económico, no genere residuos y no haya pérdidas del analito. Sin embargo la metodología analítica clásica es larga, tediosa, consume gran cantidad de disolventes caros, tóxicos y son inevitables los tratamientos posteriores.

Muestras con contenido graso, requieren un método de extracción donde ocurre la separación de los analitos de los componentes mayoritarios y un proceso de limpieza eficaz o purificación para eliminar de manera total o parcial los componentes lipídicos interferentes. Seguido de un análisis instrumental para la separación, identificación, cuantificación de los residuos y la confirmación de éstos. Para el pretratamiento de la

muestra se ha hecho uso de diferentes adsorbentes como la alúmina, la sílica gel, Florisil, C₁₈ para realizar una extracción en fase sólida (Cunha *et al.*, 2007).

En la Tabla 6, se muestran las diferentes matrices y condiciones para el proceso de extracción y la Tabla 7 muestra las columnas y equipo usado para el análisis de plaguicidas por la técnica de cromatografía de gases en muestras con matriz grasa reportadas en la literatura.

Tabla 6. Procesos usados para la extracción y purificación de muestras con contenido graso.

Matriz	Condiciones	Referencia
Alimento alto en grasa	Solventes de extracción: Hexano, acetona, etil acetato, diclorometano seguida de una limpieza con sílica gel como adsorbente.	Hrouzková, S. <i>et al.</i> , 2011.
Grasa y aceite	Solventes de extracción: 70mL Diclorometano. Seguida de una limpieza con florisil como adsorbente.	Lázaro, R. <i>et al.</i> , 1995
Grasas biológicas y ceras	Disperción con C ₁₈ y Sílica como adsorbente. Eluyendo con Acetonitrilo para Purificar	Pérez, A. <i>et al.</i> , 2010.
Productos poco grasos	Extracción con fluidos en estado supercrítico (CO ₂ :Metanol)	López y Crespi 2000.
Alimento con contenido graso	Metodología Quechers para extracción y purificación simultánea.	Anastassiades M. <i>et al.</i> , 2003.

TABLA 7. Equipo y columnas reportadas por diferentes autores para el análisis de plaguicidas por la técnica de cromatografía de gases en muestras con matriz grasa.

Aparato de CG	Columna	Fase móvil	Numero de analitos	Referencia
CG-MS/MS Agilent 7890	VF-1701 (30m* 0.25mm*0.25µm)	1mL/min He	200	He <i>et al.</i> , 2014
CG-MS Agilent 6890N/5975	HP-5MS UI (30m* 0.25mm*0.25µm)	1mL/min He	9	Omar <i>et al.</i> , 2013
CG/MS Shimadzu MS (QP2010)	DB5 (30m* 0.25mm*0.25µm)	1.7mL/min n He	95	Nguyen <i>et al.</i> , 2010.
CG/ECD/NPD Shimadzu	ZB-5(30m* 0.25mm*0.25µm) ZB-1(30m* 0.32mm*1.0µm)	1.5mL/min n He	35	Amvrazi y Albanis, 2006.

CG-MS/MS: Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas en configuración tándem.

CG-MS: Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

CG/ECD/NPD: Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de captura de electrones y detector de Nitrogeno-Fósforo.

3.6 Optimización y validación de métodos analíticos

Optimización se refiere a mejorar el rendimiento de un sistema, un proceso o un producto con el fin de obtener el máximo beneficio de él. El término optimización se ha usado comúnmente en química analítica como un medio para detectar las condiciones bajo las cuales un procedimiento produce la mejor respuesta posible. Tradicionalmente, la optimización en química analítica ha sido llevada a cabo mediante el control de la influencia de un factor a la vez en una respuesta experimental. Mientras que sólo se cambia un parámetro, otros se mantienen a un nivel constante. Esta técnica de optimización se llama una variable a la vez. Su principal desventaja es que no incluye los efectos interactivos entre las variables estudiadas. Como consecuencia, esta técnica no describe los efectos completos del parámetro en la respuesta. Otra desventaja de la optimización de un solo factor es el aumento en el número de experimentos necesarios para llevar a cabo la investigación, lo que conduce a un incremento de tiempo y costos, así como un aumento en el consumo de reactivos y materiales. Con el fin de superar este problema, la optimización de los procedimientos analíticos se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas estadísticas multivariantes. Entre estas, la de mayor relevancia es la metodología de superficie de respuesta (RSM) que es una serie de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en el ajuste de una ecuación polinómica con los datos experimentales, que debe describir el comportamiento de un conjunto de variables con el objetivo de hacer previsiones estadísticas de los datos. Se puede así aplicar cuando una respuesta o un conjunto de respuestas de interés son influenciados por diversas variables. El objetivo es optimizar simultáneamente los niveles de estas variables para conseguir el mejor rendimiento del método (Almeida *et al.*, 2008).

La implementación de un método analítico tiene como finalidad desarrollar un análisis y adaptar una técnica para una muestra específica; por otro lado la validación es un procedimiento para establecer una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño (exactitud, precisión,

especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de trabajo) que son necesarias para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración, sino también en el análisis de muestras reales (Garrido *et al.*, 2007).

3.7 Factores que influyen en la composición de AGDAS

Con el fenómeno del cambio climático, fueron predichas condiciones climáticas extremas. En muchas regiones de cultivo, el tiempo tenderá a ser más cálido con precipitaciones más irregulares y los picos en los niveles de estrés más severos en los vegetales cultivados. El reto entonces, es no sólo aumentar la producción agrícola para una población en crecimiento, sino lograrlo bajo condiciones ambientales más adversas. Además de conocer las adaptaciones fisiológicas de los cultivos que invariablemente se reflejarán en la composición química de los productos que de ellos se obtienen (Redden, 2013).

En este sentido, Anastasopoulos *et al.* (2011) determinaron que la composición química del aceite de oliva virgen estaba determinada por diversos factores tales como; etapa de maduración, año de cosecha y forma de cultivo. Los cuales tienen influencia en los índices de calidad tanto cualitativos como cuantitativos de polifenoles, escualeno, ácidos grasos y esteroides.

Por otra parte, las condiciones de temperatura, presión y tiempo de residencia en la etapa de blanqueo y deodorizado influyen en la composición de tocoferoles en AGDAS (O'Brien *et al.*, 2000). Otros factores que pudieran estar relacionados con el contenido de tocoferoles en AGDAS son los cambios climáticos y condiciones precosecha, ya que de acuerdo con Britz *et al.* (2007) y Singh *et al.* (2013) los cultivos de soya, trigo, cebada, sorgo y maíz son de los más afectados por las variaciones climatológicas. Al respecto, Britz *et al.* (2007) reportaron que el alfa tocoferol aumentó por efecto de las altas temperaturas mientras que el gama tocoferol decreció. Por otra parte, Udaondo (2012), concluyó que el α -tocopherol también juega un importante papel en la señalización celular en condiciones de estrés abiótico, ya que en plantas resistentes a la sequía se produce un aumento neto de los niveles de éste.

La interconversión de fitoesteroles libres a esterificados es muy rápida, lo que sugiere una función regulatoria a cambios en niveles de fitohormonas y a factores ambientales como luz, temperatura y estrés hídrico, además también está involucrada en cambios en propiedades de la membrana como respuesta a condiciones de estrés (Moreau *et al.*, 2002).

Los niveles de fitoesteroles esterificados se incrementan con la senescencia y como respuesta a estrés fisiológico (Wen *et al.*, 2008). Asimismo, las altas temperaturas y la localización del cultivo son factores significativos para el incremento de los niveles de fitoesteroles en semilla de soya (Vlahakis *et al.*, 2000).

De acuerdo con el Monitor de Sequía de México, el año 2011 fue anormalmente seco (Figura 9). El 31.2 % de la superficie total de México presentó sequía Extrema (D3) y el 50 % sequía Excepcional (D4), representando la más intensa de los últimos nueve años, superando a la que ocurrió en 2006, en donde la mayor afectación ocurrió en el Noroeste y el Centro del país. Ésta fue de mayor extensión y formó parte de la que afectó el

Sureste de los Estados Unidos como se aprecia en la Figura 10 (Albanil y Pascual, 2011).

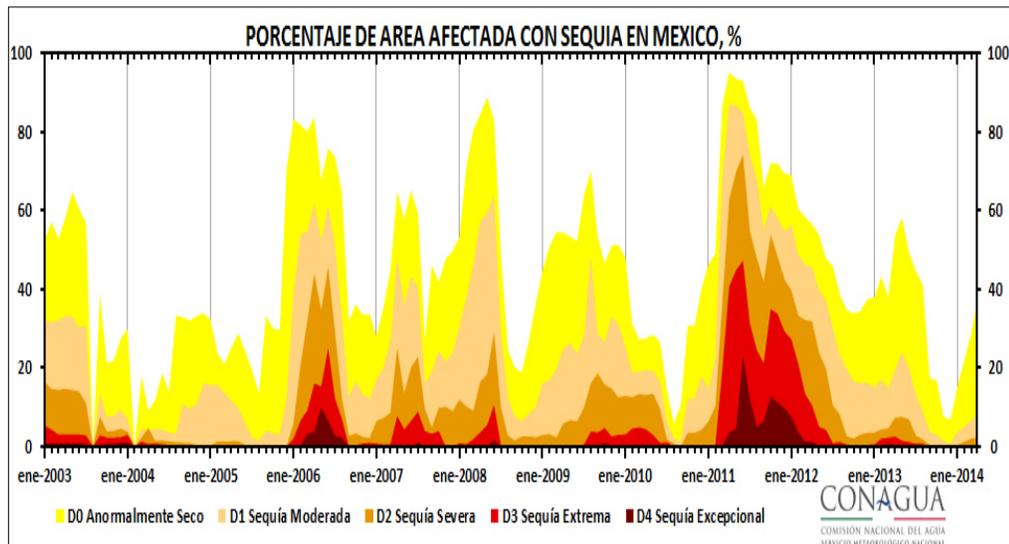


Figura 9. Monitor de Sequía de México 2003-2014 (Albanil y Pascual, 2011).

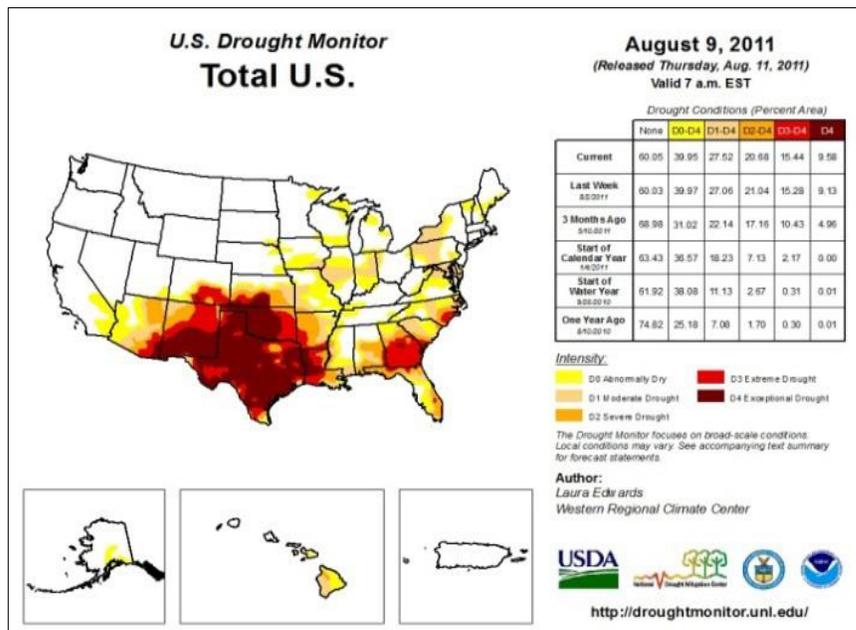


Figura 10. Afectación por sequía en el año 2011 en el sureste de Estados Unidos (Albanil y Pascual, 2011).

4.0 HIPÓTESIS

Es factible el aprovechamiento del subproducto de la etapa de desodorización del aceite de soya en base a su contenido de Tocoferoles, Fitoesteroles ($\geq 10\%$) y Escualeno ($\geq 3\%$), cuya concentración varía en función del origen, grado de calidad y condiciones de cultivo de dicha oleaginosa.

5.0 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la factibilidad del aprovechamiento del subproducto de la desodorización de aceite de soya como fuente de fitoesteroles, tocoferoles y escualeno y la influencia de los factores; procedencia, grado de calidad y condiciones de cultivo en el contenido de dichos compuestos, así como documentar el contenido de plaguicidas utilizando metodología analítica optimizada y validada.

6.0 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Optimizar la metodología analítica para la cuantificación de fitoesteroles, tocoferoles, escualeno y plaguicidas organoclorados (POC) y organofosforados (POF) en AGDAS.
2. Validar la metodología analítica para la cuantificación de fitoesteroles, tocoferoles, escualeno, POC y POF en AGDAS.
3. Cuantificar fitoesteroles, tocoferoles, escualeno, POC y POF en AGDAS con diferente procedencia (nacional y americana), grado de calidad (premium y genérico) y condiciones de cultivo (sequía y normal).
4. Establecer el contenido de fitoesteroles esterificados en AGDAS.
5. Evaluar la factibilidad del aprovechamiento del subproducto de la deodorización de aceite de soya en base a su composición.
6. Determinar mediante un análisis multifactorial si la procedencia del grano, grado de calidad y condición de cultivo influyen en la composición de los AGDAS en cuanto a los analitos en estudio.

7.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Ácidos grasos destilados del proceso de refinación de aceite de soya (AGDAS), fueron obtenidos de una planta industrial de refinación de aceite vegetal en la localidad Monterrey Nuevo León México. Un litro de muestra por quintuplicado de cada lote fueron clasificadas de acuerdo al origen, grado de calidad y condición de cultivo del grano, para posteriormente ser almacenadas a -15 °C hasta su análisis.

Como matriz de trabajo para las etapas de evaluación y validación del método de tocoferoles se utilizó una mezcla grado alimenticio, de concentración conocida (W530066-1KG-K), por tener esta una composición grasa semejante a la muestra de estudio. Como estándares de referencia se usaron α -Tocoferol (Cat., Lote), γ -Tocoferol (Cat., Lote) y δ -Tocoferol (Cat., Lote) adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Las soluciones diluidas y concentradas de tocoferoles fueron protegidos de la luz y en ambiente de nitrógeno.

Como matriz de trabajo para las etapas de optimización y validación de plaguicidas y fitoesteroles se utilizó el producto Vegapure[®] 95 FF lote GR83057002 (BASF The Chemical Company), por tener una composición grasa semejante a la matriz de estudio. La matriz tiene una concentración conocida de fitoesteroles esterificados de 97 % p/p que expresados como fitoesteroles libres equivale al 60 % p/p.

Los estándares de referencia para Escualeno (Supelco., 44-2785), β -Sitoesterol (Sigma Aldrich., 041M3907V), Campesterol (Sigma Aldrich., 061M5051V), Estigmaesterol (Sigma Aldrich., BCBD9901V), Colesterol (Sigma Aldrich., SLBC7554V) y Sílica gel grado cromatográfico 100-200 malla fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Para los plaguicidas fueron usadas soluciones estándares certificadas de Diclorvos y Clorpirifos de 1.0 mg/mL en Hexano de AccuStandard (New Haven, CT, EUA). Metil Paratión 100 μ g/mL en Acetonitrilo de Chem Service (West Chester, PA, EUA). 250mg

Malation a 97.9% de pureza de AccuStandard (New Haven, CT, EUA). Una mezcla de 18 plaguicidas TCL Pesticides Mix, 2000 µg/mL cada uno en Tolueno: Hexano (50:50), Supelco (St. Louis, MO, EUA). Mezcla de Estándar Interno-8080 en Tolueno 2000 µg/mL (Tetracloro-m-Xileno y Decaclorobifenilo) de Chem-Service (West Chester, PA, EUA). Para su preservación se almacenaron a una temperatura entre -20 °C. La lista de plaguicidas analizados en este estudio con su correspondiente número de CAS se presenta en la Tabla 8. Se preparó una solución de trabajo de 10 mg/L con 1 mL Metilparation (100 µg/mL), 100 uL Clorpirifos, Malation y Diclorvos (los tres a 1000 µg/mL) y 50 µL TCL Pesticides Mix, (2000 µg/mL) y 2mL Acetona aforado a 10 mL con Hexano (grado HPLC/Spectro 99.9%, TEDIA) y se almacenó en un vial de vidrio septa de teflón color ambar a una temperatura entre -20 °C.

El resto de los reactivos y solventes fueron de grado analítico marca Fisher Scientific (Monterey N.L. Mex.).

Tabla 8. Plaguicidas analizados en AGDAS.

Compuesto	*No. CAS	Compuesto	No. CAS
Aldrin	309-00-2	Endosulfan Sulfato	1031-07-8
α-BHC	319-84-6	Endrin	72-20-8
β-BHC	319-85-7	Endrin Aldehído	7421-93-4
γ -BHC (Lindano)	58-89-9	Endrin Cetona	53494-70-5
δ-BHC	319-86-8	Heptacloro	76-44-8
4,4'-DDE	722-55-9	Heptacloro Epóxido	1024-57-3
4,4'-DDT	50-29-3	Endosulfan Sulfato	1031-07-8
Dieldrin	60-57-1	Clorpirifus	2921-88-2
Endosulfan I	959-98-8	Metil paration	298-00-0
Endosulfan II	33123-65-9	Malation	121-75-5
Diclorvos	95828-55-0		

***El número de registro CAS es una identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones. Llamado también CAS RN (en inglés CAS registry number). US-EPA METHOD 8081A**

8.0 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

8.1 Fitoesteroles y escualeno

8.1.1 Purificación de FL, FE y escualeno (E) y su optimización mediante el método de superficie de respuesta en un diseño compuesto central (DCC).

La purificación de los fitoesteroles y escualeno se realizó en una columna de sílica gel, utilizando como eluente Hexano:Acetato etilo (90:10) para la fracción no polar y Hexano: Eter Etilico:Etanol (25:25:50) para la polar. Lo anterior con la finalidad de obtener los FE y escualeno en la fracción no polar, mientras que los FL en la fracción polar. Para evaluar la capacidad de recuperación de la fracción polar se utilizó el colesterol como analito, cuya estructura química es similar a los FL. Para optimizar la etapa de purificación se utilizó el método de superficie de respuesta en un diseño compuesto central (DCC), con variaciones en los factores independientes: volumen de eluente, cantidad de sílica gel y cantidad de fitoesteroles, escualeno y colesterol. Para determinar la mejor combinación de los tres parámetros de purificación en función del incremento de la recuperación de los FE, escualeno y colesterol se usaron cinco niveles en el DCC (Tabla 9).

Tabla 9. Variables Independientes y sus valores codificados para optimizar la purificación de escualeno, fitoesteroles libres y esterificados para su análisis.

Variable Independiente	Unidad	Símbolo	Niveles Codificados				
			-1.682	-1	0	1	1.682
Volumen de Eluente	mL	X ₁	11.6	15	20	25	28.4
Cantidad de Sílica Gel	g	X ₂	1.64	2.5	3.75	5	5.8
Cantidad de compuestos	mg	X ₃	1390	1800	2400	300	3409

El número de tratamientos en el diseño fue de $N=2k+2k+n_0$. El punto central fue replicado seis veces para obtener los grados de libertad de cinco y así calcular el error experimental. Los valores óptimos de las condiciones experimentales fueron determinados aplicando la ecuación polinomial de segundo orden (Ecuación 1) y

analizando la gráfica de contornos de la superficie de respuesta. Las variables fueron codificadas de acuerdo a la ecuación 2.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j=1}^3 (i \neq j) \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ecuación (1)}$$

Dónde:

Y es el % de recuperación del compuesto a evaluar; β_0 es la constante del coeficiente., β_i es el coeficiente lineal, β_{ii} es el efecto del coeficiente cuadrado., β_{ij} es el coeficiente del efecto de la interacción; X_i y X_j son los valores codificados de las variables i y j respectivamente.

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde X_i es el valor codificado de la variable i ; x_i el valor real no codificado de una variable independiente; x_0 el valor de X_i en el punto central; y Δx es la diferencia de cambio entre los niveles 0 y 1.

El trabajo del diseño experimental, análisis de datos, gráficas de superficie de respuesta y de contornos fue realizado en el programa estadístico Design Expert trial-version 7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN).

8.1.1.1 Tratamiento de las fracciones

La fracción no polar que contiene los FE y E, se concentró a 2 mL aproximadamente y se saponificó en baño maría a 75 °C por 1h, añadiendo 20 mL de solución de KOH en etanol al 6 % p/p. Posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido en un embudo de separación de 250 mL con dos porciones de éter etílico de 25 mL. La fracción de éter se lavó con KOH 0.25M (50 mL) y con agua destilada (50 mL), para ser colectada pasando por sulfato de sodio anhidro en un matraz bola de 100 mL,

concentrada a 3 mL aproximadamente, y finalmente se aforó a 10 mL con hexano (Verleyen, 2002).

La fracción polar que contiene el colesterol y representa a los FL se concentró a aproximadamente 3.0 mL y finalmente se aforo a 10 mL con hexano (Verleyen, 2002).

Todas las concentraciones fueron realizadas a presión reducida en rotavapor (Heildoph, Caframo LTD VV 2000) a 150 rpm, temperatura de 50 °C.

8.1.2 Validación del método analítico

Se prepararon 15 muestras sintéticas de concentración conocida de fitoesteroles pesando 0.15 g de Vegapure 95 FF aforando a 10 mL con hexano y una solución de escualeno de 2760 mg/L. De cada una de las soluciones se añadieron 0.1 mL a los cartuchos de sílica para la aplicación de la metodología de purificación y análisis previamente optimizada y obtener así las concentraciones experimentales. Con los datos obtenidos y utilizando las ecuaciones estadísticas correspondientes (3, 4, 5, 6 y 7) se calcularon los siguientes parámetros de Validación: Precisión en condiciones de reproducibilidad, repetibilidad, exactitud expresada como sesgo, incertidumbre, Límite de detección (LDM), Límite de cuantificación (LCM) y rango de trabajo.

8.1.2.1 Cálculo de la Precisión inicial del método

Dado que la precisión del método está en función de la variabilidad de las mediciones, ésta se calculó en términos del porcentaje de desviación estándar relativa (Sr), a partir de los resultados analíticos obtenidos, mediante la ecuación 3 (Harvey, 2002).

$$Sr = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde:

s: Desviación estándar

\bar{X} : Valor promedio de las concentraciones de las 15 réplicas

8.1.2.2 Cálculo de la exactitud o sesgo del método:

La exactitud o sesgo es una medida de la proximidad existente entre la medida de la tendencia central y el teórico o el valor esperado, μ . La exactitud se representa como un error relativo porcentual (Er), mediante la siguiente ecuación 4 (Harvey, 2002).

$$Er = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

Donde:

\bar{X} : Valor promedio de las concentraciones de las 15 réplicas

μ : Valor teórico o esperado

8.1.2.3 Incertidumbre

En consideración de que la incertidumbre de una medición, se define como el intervalo estadístico dentro del cual se tiene una probabilidad de que se encuentre el valor verdadero. La incertidumbre es en cierta medida subjetiva y se debe tomar como la duda que se tiene del resultado de la medición, debido a los errores que se cometen y que no se corrigen.

Para el cálculo de la incertidumbre se consideraron todas las fuentes de ésta que afectan a la medición y se incluyeron en la fórmula de la propagación de las incertidumbres estándar usando la ecuación 5 (Harvey, 2002).

$$\frac{\mu_c(C_m)}{C_m} = \sqrt{\sum \left(\frac{\mu(x_{i...j})}{x_{i...j}}\right)^2} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde:

$\frac{\mu_c(C_m)}{C_m}$: Incertidumbre combinada relativa al nivel de concentración.

$\sum \left(\frac{\mu(x_{i...j})}{x_{i...j}}\right)^2$: Sumatoria de cada una de las fuentes de incertidumbre relativa al nivel de medición de cada fuente, para conocer la contribución de cada fuente a la incertidumbre combinada.

La incertidumbre combinada obtenida se multiplicó por el factor de cobertura $k=2$ para obtener así la incertidumbre expandida para un nivel de confianza del 95%, finalmente se reporta relativa a la concentración promedio experimental con la que se estimó.

8.1.2.4 Cálculos para el LDM y LCM

Estos parámetros están relacionados con la sensibilidad del método. El límite de detección (LDM) se define como la cantidad de analito presente que se deriva de la menor señal analítica que puede detectarse con certeza razonable.

Como la señal del blanco debe coincidir con el intercepto de la curva de calibración, puesto que es la que se obtendrá a una concentración del analito igual a cero. El LDM se calculó con la ecuación 6 (González, 2007).

$$\text{LDM} = \frac{3S_a}{b} \quad \text{Ecuación (6)}$$

S_a : Desviación estándar de la ordenada.

b : Pendiente en la curva de calibración.

El LCM se define como la cantidad de analito presente derivada de la menor señal analítica que puede ser medida con precisión y exactitud. De manera análoga al LDM, la IUPAC propone como LCM al valor obtenido en la ecuación 7 (González, 2007).

$$\text{LCM} = \frac{10S_a}{b}$$

Ecuación (7)

8.1.2.5 Rango de Trabajo

Se considera rango de trabajo como el intervalo de concentraciones de la curva de calibración expresado en % p/p en consideración del tratamiento dado a la muestra; es decir, incluye peso de muestra, factores de dilución y/o concentración.

8.1.3 Evaluación de la precisión obtenida en condiciones de reproducibilidad

La evaluación de la precisión se realizó con la ecuación del coeficiente de HorRat (Horwitz y Albert, 2006), que dedujo una expresión para predecir el valor de precisión a partir de la concentración del analito C, (Ecuación 8).

$$\text{PRSD(R)} = 2C - 0.15$$

Ecuación (8)

La precisión obtenida se compara con la pronosticada PRSD(R) mediante el Coeficiente de HorRat (Ecuación 9).

$$\text{HorRat} = \text{RSD (R)} / \text{PRSD (R)}$$

Ecuación (9)

8.1.4 Evaluación de dos Modalidades de Cuantificación y la etapa de derivatización para Fitoesteroles totales

Con el fin de establecer una metodología que impacte en la disminución de costos, tiempo y generación de residuos peligrosos, sin detrimento en la calidad de los resultados analíticos, se evaluaron dos modalidades de cuantificación (usando colesterol como estándar interno vs estándar externo) y metodologías considerando la

derivatización (inclusión vs exclusión). Para esta etapa se trabajó con los extractos obtenidos en la validación. En las modalidades de cuantificación se realizaron curvas de calibración para los diferentes fitosteroles. La derivatización se realizó con N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida con 1% de triclorometil silano (TMCS) con las condiciones óptimas reportadas (Kumirska *et al.*, 2011). Los resultados fueron analizados utilizando el modelo de muestras pareadas (t de student).

8.1.5 Análisis de AGDAS

Con la metodología optimizada y validada se realizó la cuantificación de los FL, FE, y E en AGDAS.

El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Gases 6890N acoplado a un espectrómetro de masas 5973N con una columna capilar HP 5MS: 30 m*0.25 mm*0.25 μ m (Agilent Technologies, Alemania). Se determinó el contenido de FE y E en el extracto de la fracción no polar y los FL en el extracto de la fracción polar. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de la columna 190 °C, se mantuvo por 1min, después se alcanzó la temperatura de 300 °C con una rampa de 15 °C, se mantuvo por 10 min. Temperatura del Inyector y detector 270 °C y 230 °C respectivamente, gas acarreador helio con un flujo de 0.8 mL/min.

8.2 Tocoferoles

8.2.1 Estimación de la concentración exacta del stock de α -Tocoferol, γ -Tocoferol y δ -Tocoferol.

Se disolvió el contenido de cada una de las ampulas que contenía los tocoferoles en 10 mL de hexano. Estas soluciones se diluyeron en metanol ajustando a un rango de 0.2 - 0.9 unidades de absorbancia a una longitud de onda 298 nm para γ -Tocoferol y δ -Tocoferol y de 292 nm para α -Tocoferol. Con estas lecturas y los correspondientes coeficientes de extinción para el solvente usado, se estimó la concentración de cada uno (Tabla 10).

Tabla 10. Coeficientes de extinción usados para calcular la concentración de tocoferoles en los estándares de calibración para el solvente correspondiente y longitud de onda.

Compuesto	Solvente	Longitud de Onda (nm)	Coefficiente de Extinción*
α-Tocoferol	Metanol	292	76.0
δ-Tocoferol	Metanol	298	87.0
γ-Tocoferol	Metanol	298	91.0

*(ϵ l%1cm)

8.2.2 Validación del método analítico

Se prepararon 15 muestras sintéticas de concentración conocida de tocoferoles pesando 0.14 g de la mezcla de éstos y aforando a 10 mL. De cada una se tomaron 0.01 mL y se aforaron a 1.0 mL con hexano. Estas soluciones fueron analizadas por la técnica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Con los datos obtenidos y utilizando las ecuaciones estadísticas se calcularon los correspondientes parámetros de validación: Precisión en condiciones de reproducibilidad (Ecuación 3), Exactitud o error relativo (Ecuación 4), Incertidumbre (Ecuación 5), Límite de detección del método (Ecuación 6), y Límite de cuantificación del método y Rango de Trabajo (Ecuación 7).

8.2.3 Evaluación de la precisión obtenida en condiciones de reproducibilidad

La evaluación de la precisión se realizó con la ecuación del coeficiente de Horrat en el cual se establece una expresión para predecir el valor de precisión a partir de la concentración del analito C (Ecuación 8). La precisión obtenida se compara con la pronosticada PRSD(R) mediante el coeficiente de Horrat (Ec. 9).

8.2.4 Evaluación de dos modalidades de cuantificación y dos técnicas analíticas para el análisis de tocoferoles.

Para esta etapa se trabajó con las soluciones extractos obtenidas en la validación, pero variando las modalidades de la cuantificación y la técnica analítica anteriormente

mencionados. Se realizó una comparación de medias con la prueba de t de student, utilizando el modelo de muestras pareadas dos modalidades de cuantificación: estándar interno (colesterol) y estándar externo (curva de calibración para cada uno de los tocoferoles a cuantificar). Así como la evaluación de dos métodos analíticos; el de cromatografía de gases utilizando el espectrómetro de masas como detector con columna capilar no polar y el de cromatografía de líquidos con detector de UV a 297 nm con columna C8 (50 mm, 3 mm, 3 μ m, 100 Å).

8.2.5 Análisis de AGDAS

Con la metodología optimizada y validada se realizó la cuantificación de tocoferoles en AGDAS. El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Gases 6890N acoplado a un espectrómetro de masas 5973N con una columna capilar HP 5MS: 30 m * 0.25 mm * 0.25 μ m (Agilent Technologies, Alemania). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de la columna 190 °C, se mantuvo por 1min, después se alcanzó la temperatura de 300 °C con una rampa de 15 °C, se mantuvo por 10 min. Temperatura del Inyector y detector 270 °C y 230 °C respectivamente, gas acarreador helio con un flujo de 0.8 mL/min.

8.3 Plaguicidas

8.3.1 Análisis factorial para la optimización de la purificación de plaguicidas.

Se evaluaron los dos factores más influyentes en la recuperación de plaguicidas con dos respectivos niveles (2x2x3):

- a) Volumen de eluente: 5 mL y 9 mL
- b) Tipo de adsorbente: C18 y Florisil

Cada tratamiento se realizó por triplicado en un diseño aleatorio como se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Diseño Experimental Bifactorial (2x2x3).

Tratamiento	Volumen de Eluente (mL)	Tipo de Adsorbente
1	5	C18

2	5	C18
3	9	C18
4	9	Florisil
5	9	Florisil
6	5	Florisil
7	9	C18
8	9	Florisil
9	5	C18
10	5	Florisil
11	9	C18
12	5	Florisil

8.3.2 Procedimiento de extracción para cada tratamiento

Se pesaron 1.0 g de Vegapure 95 FF por tener similitud en contenido graso a la muestra en estudio. Se fortificó con 100 μ L de la solución de trabajo de plaguicidas, después se agitó por 1 min, se añadió 4 mL de agua fría destilada y se agitó por 1 min, después se le agregó 10 mL de ACN y se agitó por 1 min. Enseguida se le añadió 3 g de $MgSO_4$ y se agitó vigorosamente por 1 min, se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, se tomó la fase de ACN y se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 mL que contiene 1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA y 400 mg C₁₈, se agitó por un 1 min y se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, Se recuperó el ACN y se concentró a un volumen 2mL.

8.3.3 Optimización del proceso de purificación

Se aplicó el diseño experimental para cada uno de los tratamientos (Tabla 9), usando Florisil (FL-PR; 1000 mg/6mL), C₁₈ (55 μ m, 70 A 1000 mg/6mL) y un volumen de 5 o 9 mL de acetonitrilo según el tratamiento. En la Figura 11 se muestra el diagrama completo que incluye el proceso de extracción y la etapa de optimización de la purificación.

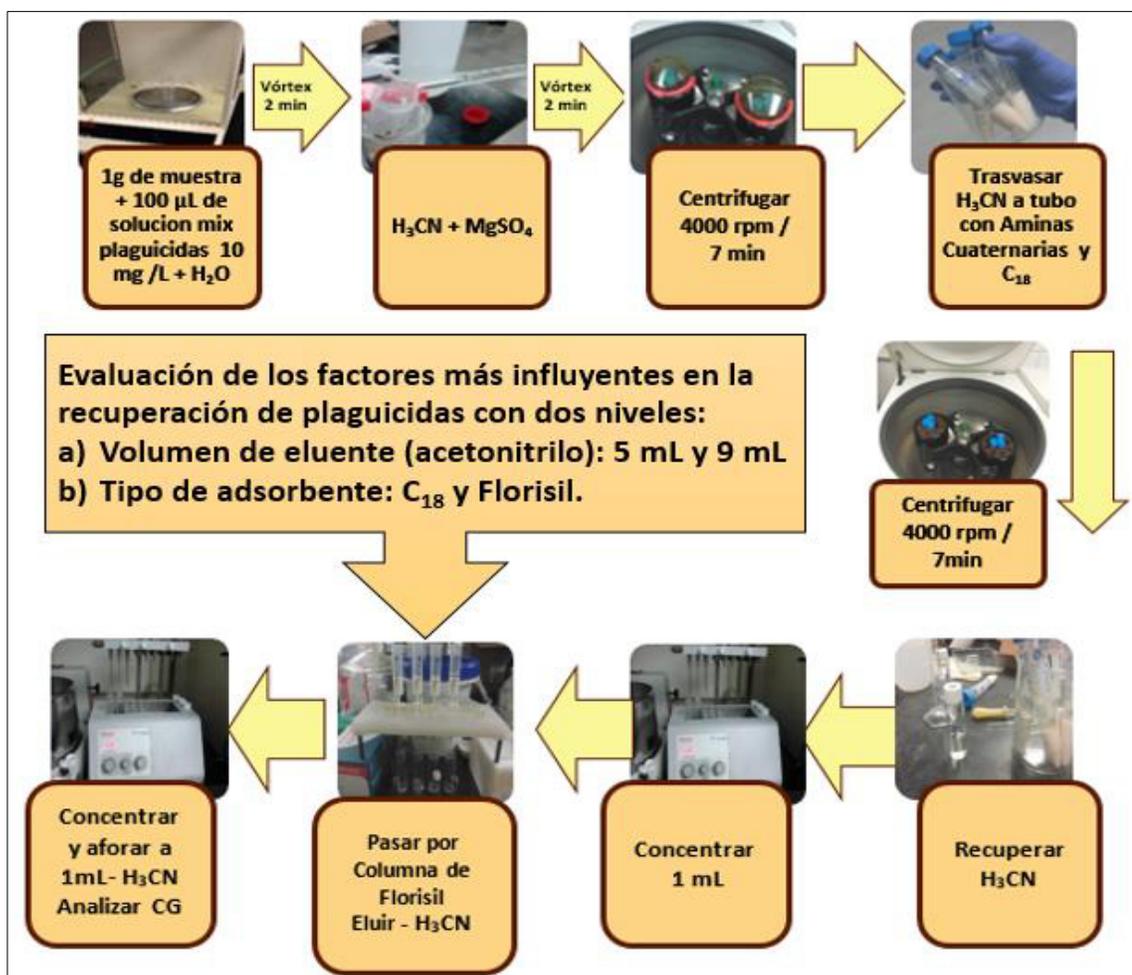


Figura 11. Diagrama de extracción y optimización de la purificación de plaguicidas en AGDAS

Los extractos obtenidos fueron analizados bajo las condiciones instrumentales que se muestran en la Tabla 12 (Análisis Cuantitativo).

Tabla 12. Condiciones cromatográficas para el análisis de plaguicidas en AGDAS.

	Análisis Confirmatorio	Análisis Cuantitativo
Cromatógrafo	Hewlett-Packard 5890 Serie II con automuestreador HP 7673	
Columna	SPB-608	HP-1701
Inyector	Splitless	Splitless
Gas acarreador	Nitrógeno	Nitrógeno
Flujo de gas acarreador	3 mL/min	1 mL/min
Gas auxiliar	Nitrógeno	Nitrógeno
Flujo de gas auxiliar	50 mL/min	50 mL/min
Temperatura del inyector	220 °C	220 °C
Temperatura del Detector	300 °C	300 °C
Temperatura Inicial	80 °C, 1.0 min	80 °C, 1.0 min
Programa de Temperaturas	80 °C a 190 °C a 30 °C/min. 190 °C a 290 °C a 6 °C/min.	80 °C a 190 °C a 30 °C/min. 190 °C a 290 °C a 6 °C/min.
Temperatura Final	290 °C, 6 min.	290 °C, 6 min.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores, utilizando el programa estadístico MINITAB (Versión 14.12, PA, USA) con un nivel de confianza del 95 %.

8.3.4 Validación para plaguicidas

Se prepararon 15 muestras sintéticas de concentración conocida de plaguicidas pesando 1 g de Vegapure 95 FF y añadiendo a cada una de las muestras 0.025 μ L de la solución de trabajo de plaguicidas, quedando una concentración teórica de 0.25 mg/L. A cada muestra se le aplicó el procedimiento de extracción mencionado anteriormente seguido del proceso de purificación optimizado con el diseño factorial. Los extractos obtenidos fueron analizados por la técnica de cromatografía de gases con detector de captura de electrones, bajo las condiciones presentadas en la Tabla 12. Con los datos obtenidos y utilizando las ecuaciones estadísticas se calcularon los correspondientes parámetros de validación: (Precisión en condiciones de reproducibilidad (Ecuación 3), Exactitud o error relativo (Ecuación 4), Incertidumbre (Ecuación 5), Límite de detección del método (Ecuación 6), y Límite de cuantificación del método y Rango de Trabajo (Ecuación 7).

8.3.5 Evaluación de la precisión obtenida en condiciones de reproducibilidad

La evaluación de la precisión se realizó con la ecuación del coeficiente de Horrat (Horwitz y Albert, 2006), en el cual se establece una expresión para predecir el valor de precisión a partir de la concentración del analito C (Ecuación 8). La precisión obtenida se compara con la pronosticada PRSD(R) mediante el coeficiente de Horrat (Ecuación 9).

8.3.6 Análisis AGDAS

Con la metodología optimizada y validada se realizó la cuantificación de plaguicidas en AGDAS. Los extractos obtenidos fueron analizados bajo las condiciones instrumentales que se muestran en la Tabla 12 (Análisis Cuantitativo).

Considerando que se encontró la presencia de malatión en todas las muestras analizadas, fue necesario realizar una prueba confirmatoria (EPA 8081B, 2007). En este caso consistió en analizar nuevamente las muestras con una columna alternativa (SPB-608) de polaridad diferente a la utilizada en la cuantificación inicial (HP-1701), con las condiciones descritas en la Tabla 12 (Análisis Confirmatorio), para obtener un patrón cromatográfico contrastante.

9.0 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO

Una vez realizado el análisis de los compuestos de interés con la metodología optimizada y validada, con los resultados obtenidos de la composición de los AGDAS, se realizó un análisis multifactorial con arreglo completamente al azar, ya que éste permite investigar todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores, así como sus interacciones para determinar el efecto de la procedencia del grano, calidad del aceite y las condiciones de cultivo de soya, bajo el siguiente diseño experimental $axbxcxn$:

a=Procedencia: Americano, Nacional

b= Calidad del aceite: Premium, Genérico

c= Condiciones de cultivo: Sequía y normal

n= 5 repeticiones

Para el análisis multifactorial, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de tres factores y comparación múltiple de medias para establecer diferencias mínimas significativas entre los factores, utilizando el programa estadístico MINITAB (Versión 14.12, PA, USA) con un nivel de confianza del 95 %.

10.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Escualeno Fitoesteroles Libres y Esterificados

10.1.1 Optimización de la purificación de FL, FE y E mediante el método de superficie de respuesta (MSR)

El MSR fue aplicado para modelar y optimizar en AGDAS el procedimiento de purificación de los FL, FE y E. El plan del DCC y las respuestas observadas y estimadas (% de recuperación) para cada corrida se muestran en las tablas 13, 14 y 15 para fitoesteroles esterificados, escualeno y colesterol (Fitoesteroles libres) respectivamente, todos los experimentos se efectuaron de manera aleatoria.

Tabla 13. Porcentajes de recuperación experimentales y estimadas obtenidas con el plan DCC para cada corrida del diseño de FE.

Tratamiento	Valores para la variable independiente			% de Recuperación (Y)	
	mL Eluente	g de Sílica gel	mg de FE	Observado	Estimado
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	15	2.5	1800	51.2	55.0
2	25	2.5	1800	75.0	61.7
3	15	5	1800	15.0	8.5
4	25	5	1800	59.9	59.3
5	15	2.5	3000	69.0	64.8
6	25	2.5	3000	58.0	59.6
7	15	5	3000	15.0	23.5
8	25	5	3000	71.1	62.4
9	11.6	3.75	2400	26.9	23.6
10	28.4	3.75	2400	51.8	62.0
11	20	1.64	2400	56.8	61.7
12	20	5.8	2400	23.0	25.0
13	20	3.75	1390	53.0	60.5
14	20	3.75	3409	72.0	71.4
15	20	3.75	2400	80.0	73.1
16	20	3.75	2400	75.0	73.1
17	20	3.75	2400	78.0	73.1
18	20	3.75	2400	75.0	73.1
19	20	3.75	2400	72.0	73.1
20	20	3.75	2400	60.0	73.1

DCC: diseño compuesto central. FE: Fitoesteroles esterificados.

Tabla 14. Plan del DCC y las respuestas experimentales y estimadas (% de Recuperación) para cada corrida de E.

Tratamiento	Valores para la variable independiente			% de Recuperación (Y)	
	mL Eluente X ₁	g de Sílica gel X ₂	mg de E X ₃	Observado	Estimado
1	15	2.5	1800	49.0	54.4
2	25	2.5	1800	72.0	60.1
3	15	5	1800	20.0	16.1
4	25	5	1800	35.9	33.4
5	15	2.5	3000	49.2	47.7
6	25	2.5	3000	54.2	54.2
7	15	5	3000	20.0	27.9
8	25	5	3000	55.4	46.0
9	11.6	3.75	2400	28.3	21.7
10	28.4	3.75	2400	29.5	41.7
11	20	1.64	2400	58.9	61.8
12	20	5.8	2400	20.0	22.7
13	20	3.75	1390	50.0	55.8
14	20	3.75	3409	60.9	60.8
15	20	3.75	2400	80.0	71.0
16	20	3.75	2400	75.0	71.0
17	20	3.75	2400	69.0	71.0
18	20	3.75	2400	76.0	71.0
19	20	3.75	2400	56.7	71.0
20	20	3.75	2400	70.0	71.0

DCC: diseño compuesto central. E:Escualeno.

Tabla 15. Plan del DCC y las respuestas experimentales y estimadas (% de Recuperación) para cada corrida de FL.

Tratamiento	Valores para la variable independiente			% de Recuperación (Y)	
	mL Eluente X ₁	g de Sílica gel X ₂	mg de colesterol X ₃	Observado	Estimado
1	15	2.5	1800	46.5	52.6
2	25	2.5	1800	76.0	64.6
3	15	5	1800	15.0	10.6
4	25	5	1800	36.4	34.7
5	15	2.5	3000	48.6	48.0
6	25	2.5	3000	49.3	51.4
7	15	5	3000	25.0	34.0
8	25	5	3000	57.9	49.5
9	11.6	3.75	2400	26.9	19.8
10	28.4	3.75	2400	32.5	42.9
11	20	1.64	2400	61.8	63.0
12	20	5.8	2400	23.9	26.1
13	20	3.75	1390	48.5	54.1
14	20	3.75	3409	65.0	62.7
15	20	3.75	2400	76.0	71.2
16	20	3.75	2400	66.0	71.2
17	20	3.75	2400	70.0	71.2
18	20	3.75	2400	85.0	71.2
19	20	3.75	2400	75.0	71.2
20	20	3.75	2400	55.9	71.2

DCC: diseño compuesto central. FL: Fitoesteroles libres (colesterol).

Con el análisis de regresión para el ajuste a la función respuesta (Y), el modelo de segundo orden expresado por la Ecuación 2 (valores tomados para las variables son los correspondientes codificados) manifiesta que el porcentaje de recuperación del compuesto evaluado, está en función de X₁, X₂ y X₃. Los modelos obtenidos en este estudio para la purificación de FE, E y FL (colesterol) se muestran en las ecuaciones 10, 11 y 12 respectivamente.

$$Y = 70.96 + 5.95X_1 - 11.61X_2 + 1.48X_3 + 2.91X_1X_2 + 0.91X_1X_3 + 4.64X_2X_3 - 13.87X_1^2 - 10.14X_2^2 - 4.48X_3^2$$

Ecuación (10)

$$Y = 71.22 + 6.88X_1 - 10.97X_2 + 2.54X_3 + 3.01X_1X_2 - 2.16X_1X_3 + 7.01X_2X_3 - 14.09X_1^2 - 9.44X_2^2 - 4.53X_3^2$$

Ecuación (11)

$$Y = 73.14 + 11.40X_1 - 10.91X_2 + 3.22X_3 + 11.03X_1X_2 - 2.95X_1X_3 + 1.30X_2X_3 - 10.73X_1^2 - 10.53X_2^2 - 2.54X_3^2$$

Ecuación (12)

Estas ecuaciones fueron usadas para obtener las respuestas estimadas. El grado de ajuste al modelo cuadrático fue determinado por el análisis de varianza (ANOVA), para los compuestos evaluados, donde se puede observar la significancia estadística del modelo (Tabla 16a, 16b, y 16c).

Tabla 16a. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) obtenido para el método de superficie de respuesta en la determinación de Fitoesteroles esterificados.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Valor F	Valor-p Prob > F	
Modelo	7566.25	9	840.69	9.85	0.0007	<i>Significativo</i>
A-mL de eluente	1774.58	1	1774.58	20.79	0.0010	<i>Significativo</i>
B-Silica Gel	1626.60	1	1626.60	19.06	0.0014	<i>Significativo</i>
C-mg de muestra	141.46	1	141.46	1.66	0.2269	
AB	972.41	1	972.41	11.39	0.0071	
AC	69.62	1	69.62	0.82	0.3877	
BC	13.52	1	13.52	0.16	0.6990	
A²	1658.02	1	1658.02	19.43	0.0013	<i>Significativo</i>
B²	1598.45	1	1598.45	18.73	0.0015	<i>Significativo</i>
C²	93.08	1	93.08	1.09	0.3209	
Residual	853.44	10	85.34			
Falta de ajuste	602.10	5	120.42	2.40	0.1798	<i>No significativo</i>
Error puro	251.33	5	50.27			
Total	8419.69	19				R ² =0.898

Tabla 16b. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) obtenido para el método de superficie de respuesta en la determinación de Escualeno.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Valor F	Valor-p Prob > F	
Modelo	6562.57	9	729.17	7.93	0.0016	<i>Significativo</i>
A-mL de eluente	484.20	1	484.20	5.26	0.0447	<i>Significativo</i>
B-Silica Gel	1840.04	1	1840.04	20.01	0.0012	<i>Significativo</i>
C-mg de muestra	29.97	1	29.97	0.33	0.5807	
AB	67.86	1	67.86	0.74	0.4105	
AC	0.28	1	0.28	3.058E-003	0.9570	
BC	172.05	1	172.05	1.87	0.2013	
A²	2772.14	1	2772.14	30.14	0.0003	<i>Significativo</i>
B²	1481.58	1	1481.58	16.11	0.0025	<i>Significativo</i>
C²	289.56	1	289.56	3.15	0.1064	
Residual	919.73	10	91.97			
Falta de ajuste	588.32	5	117.66	1.78	0.2720	<i>No significativo</i>
Error puro	331.41	5	66.28			
Total	7482.30	19				R ² =0.897

Tabla 16c Resultados del análisis de varianza (ANOVA) obtenido para el método de superficie de respuesta en la determinación de Fitoesteroles libres (Colesterol).

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Valor F	Valor-p Prob > F	
Modelo	6769.02	9	752.11	7.24	0.0024	Significativo
A-mL de eluente	645.87	1	645.87	6.22	0.0318	Significativo
B-Sílica Gel	1644.01	1	1644.01	15.83	0.0026	Significativo
C-mg de muestra	87.91	1	87.91	0.85	0.3792	
AB	72.60	1	72.60	0.70	0.4226	
AC	37.41	1	37.41	0.36	0.5617	
BC	393.40	1	393.40	3.79	0.0802	
A²	2861.61	1	2861.61	27.55	0.0004	Significativo
B²	1284.83	1	1284.83	12.37	0.0056	Significativo
C²	295.44	1	295.44	2.84	0.1226	
Residual	1038.55	10	103.85			
Falta de ajuste	548.14	5	109.63	1.12	0.4529	No significativo
Error puro	490.41	5	98.08			
Total	7807.57	19			$R^2=0.867$	

También se observó una concordancia en la significancia de efecto lineal para los factores gramos de sílica gel y volumen de eluente para cada uno de los compuestos, por lo tanto el porcentaje de recuperación puede ser explicado por los modelos de las ecuaciones 10, 11 y 12 que establecen que éste es dependiente de los gramos de sílica gel y volumen de eluente y no así de los miligramos de los compuestos ($P > 0.05$).

Además el ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión se comprobó con el coeficiente de determinación (R^2), encontrándose valores de 0.867, 0.897 y 0.898 en los modelos para los FL (Colesterol), escualeno y FE respectivamente. Lo anterior indica que el 87, 90 y 90 % de las variaciones en los porcentajes de recuperación de los compuestos es atribuido a los factores significativos (variables independientes). Además el valor de la precisión adecuada fue de 8.4, 8.0 y 9.9 citadas en el mismo orden que se hizo anteriormente, indicando que el modelo puede ser usado para explorarse en el espacio del diseño. Aunque estos valores pudieran parecer bajos en estadística aplicada, es importante mencionar que en el proceso evaluado (purificación de FE, E y FL) se trabajó con una matriz de la misma complejidad que la de la muestra real (AGDAS). Es

decir, se trata de un concentrado de impurezas por ser un subproducto de la industria alimentaria, lo que implicó añadir al proceso las etapas de saponificación, extracción, concentración y análisis después de la purificación. Al mismo tiempo, estos resultados pueden ser considerados apropiados, de acuerdo a Pinho *et al.* (2011), quienes enfatizan en la aceptación de cualquier modelo cuando $R^2 > 0.75$.

La combinación óptima de los factores que proporcionaron el máximo porcentaje de recuperación de FL (colesterol), E y FE de la matriz de ensayo se muestran en las gráficas de contornos para cada modelo (Figura 12). Donde los valores estimados bajo la combinación óptima se señalan y corresponde a 21.0 mililitros del eluente (fase polar y no polar) y 3.0 g de sílica gel, los cuales representan una disminución significativa del 72 y 80 %, respectivamente, con relación a los valores referenciados por Verleyen *et al.* (2002) quienes utilizaron 75 mililitros y 15 gramos, respectivamente, para muestras de aceite vegetal.

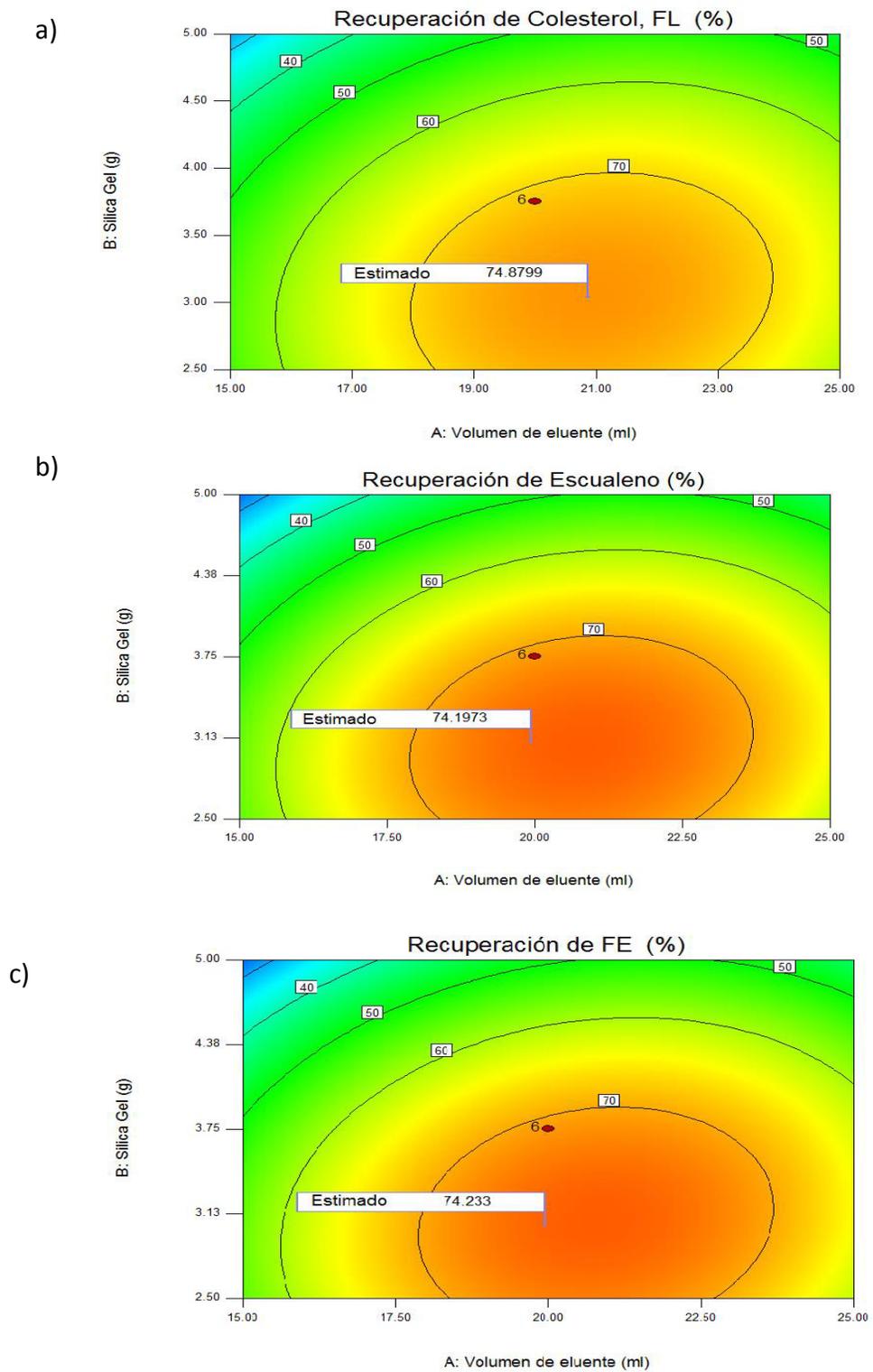


Figura 12. Gráfica de contorno que muestra la interacción entre gramos de sílica y volumen de eluente, para estimar el mayor % de recuperación en el diseño para los compuestos evaluados. a) FL (colesterol); b) Escualeno; c) Fitoesteros esterificados (FE).

10.1.2 Validación del método analítico

Los parámetros de validación para Campesterol, Estigmasterol, β -Sitoesterol y Escualeno se presentan en la Tabla 17. Para el límite de cuantificación del método (LCM) y límite de detección del método (LDM) se obtuvieron rangos de 0.257-1.425 % p/p. Los intervalos de porcentaje de exactitud, recuperación, repetibilidad y reproducibilidad fueron de -18.7-10, 88.0-110.0, 4.96-8.79 y 10.7-12.9 respectivamente. El porcentaje de incertidumbre relativa ± 9.32 -15.55. El rango de trabajo se estableció entre 0.32 y 6.69 % p/p para las cuatro formas. En el Anexo I se presentan los resultados de muestras sintéticas para la validación de de Fitoesteroles

Tabla 17. Resultados en porcentajes de los parámetros de validación para fitoesteroles totales y escualeno.

COMPUESTO	PARAMETRO DE VALIDACIÓN	LDM(% p/p)	LCM(% p/p)	Exactitud (sesgo)	Recuperación	Repetibilidad	Reproducibilidad	Incertidumbre	Rango de Trabajo (% p/p)
	Campesterol		0.436	1.425	-7.3	92.7	8.79	12.9	15.55
Estigmasterol		0.257	0.857	-18.7	81.3	4.96	12.9	9.32	0.32-6.58
β -Sitoesterol		0.425	1.417	10.0	110.0	5.54	10.7	13.12	0.32-6.59
Escualeno		0.412	1.376	-12	88.0	7.87	11.0	13.92	0.32-6.57

Como se observa, los porcentajes de recuperación obtenidos están en los rangos de 81.3-110, siendo mayores a los % de recuperación obtenidos con los parámetros seleccionados como óptimos en el diseño. La mejora se atribuye al número de réplicas que se realizaron para la validación (15), en contraste con el diseño que solo se realizó un duplicado por tratamiento. El presente estudio resalta así, la necesidad que existe en los procesos de química analítica, de evaluar mediante el protocolo de validación de métodos analíticos, las condiciones óptimas encontradas, ya sea por DCC o cualquier otro método estadístico.

10.1.3 Evaluación de la precisión obtenida en condiciones de reproducibilidad

La precisión, determinada mediante el coeficiente de Horrat (Ecuación 9), se muestran para los diferentes compuestos en la Tabla 18. En la práctica, los resultados de Horrat aceptables oscilan entre 0.5 y 2.16, por lo cual, los valores obtenidos están dentro de dicho rango. De esta forma, se puede establecer que se logró un método con precisión en condiciones de reproducibilidad aceptable.

Tabla 18. Índice de Horrat para cada uno de los compuestos validados.

Compuesto	RSDR	PRSDR	*HORRAT
Beta-Sitoesterol	10.72	9.12	1.18
Campesterol	12.91	9.46	1.36
Estigmaesterol	12.85	11.91	0.926
Escualeno	11.00	9.85	1.12

*Rango aceptable 0.5 - 2.

RSDR= Precisión en condiciones de reproducibilidad.

PRSDR= Precisión pronosticada HORRAT= Relación de Horwitz

10.1.4 Evaluación de las Modalidades de Cuantificación y de la etapa de derivatización para Fitoesteroles totales

No se encontró diferencia significativa entre las modalidades de cuantificación (estandar interno vs extero), ni entre el pretratamiento de derivatización y sin derivatizar, como se muestra en la figura 13A y B respectivamente.

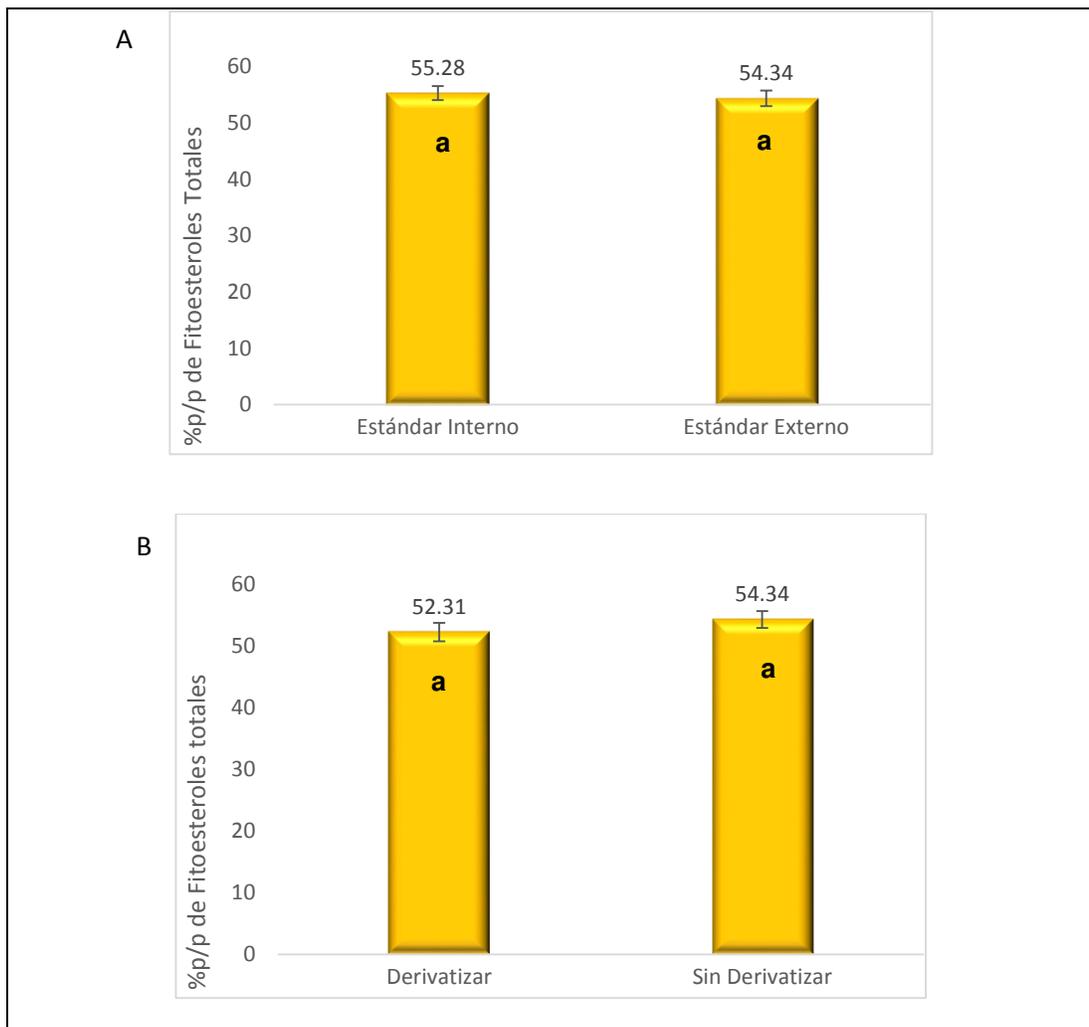


Figura 13. Porcentaje de fitosteroles totales determinados con las dos modalidades de cuantificación (A) y porcentaje de fitosteroles totales determinados con la etapa de derivatización y sin derivatizar (B). Letras iguales sobre las barras significa que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Media de 10 réplicas.

Con base en lo anterior se puede considerar que la metodología de cuantificación con estándar interno y eliminando el pretratamiento de derivatización es más apropiada. Lo que significaría una disminución de costo, tiempo y residuos tóxicos, sin detrimento en la calidad de los resultados analíticos. Lo anterior difiere de otros autores que han reportado metodologías donde consideran la derivatización como un pretratamiento del extracto antes de su análisis por cromatografía de gases. Yan *et al.* (2012) utilizaron

anhídrido acético y piridina para la derivatización, mientras que Wen *et al.* (2008) utilizaron bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y piridina. Otros autores, para evitar la derivatización utilizaron la técnica de cromatografía de líquidos con detector de UV (Khaton *et al.*, 2009), sin embargo, resulta ser más costosa y menos robusta con respecto a la técnica de cromatografía de gases. Por otra parte, sí bien es cierto que ya existen referencias del uso de estándar interno para la cuantificación (Breinholder *et al.*, 2002; Haoujun *et al.*, 2010), ninguna de estas lo avala realizando una comparación estadística contra el uso de estándar externo.

10.1.5 Análisis de fitosteroles y escualeno en AGDAS

La metodología analítica optimizada y validada se aplicó para la cuantificación de FT, FE, FL y E en AGDAS provenientes del grado de refinación premium y genérico, americano y nacional, así como cultivado bajo condiciones normales y de sequía. En el Anexo II se muestran los reportes de análisis de Fitoesteroles esterificados y libres.

Los valores promedio de cinco réplicas para fitoesteroles totales de las diferentes condiciones evaluadas se muestran en la figura 14. Como promedio global se encontró una concentración de fitoesteroles totales de 14.92 % p/p, la cual resulta mayor a las reportadas por Dumont *et al.*, (2007) y Khaton *et al.*, (2009), quienes reportan concentraciones en un rango de 6.1 – 7.8%. Sin embargo, este valor está por debajo de la concentración de 20% reportada por Ito *et al.* (2005).

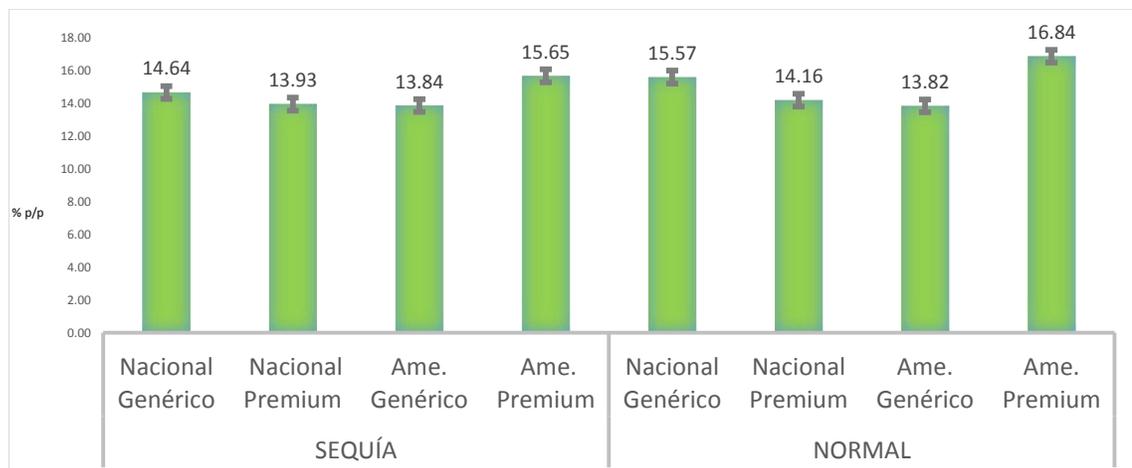


Figura 14. Contenido de Fitoesteroles totales en AGDAS de diferente procedencia, grado de calidad y condición de cultivo.

Los valores promedio de cinco réplicas para fitoesteroles esterificados de las diferentes condiciones evaluadas se muestran en la figura 15. Como promedio global se encontró una concentración de FE de 3.23 % p/p.

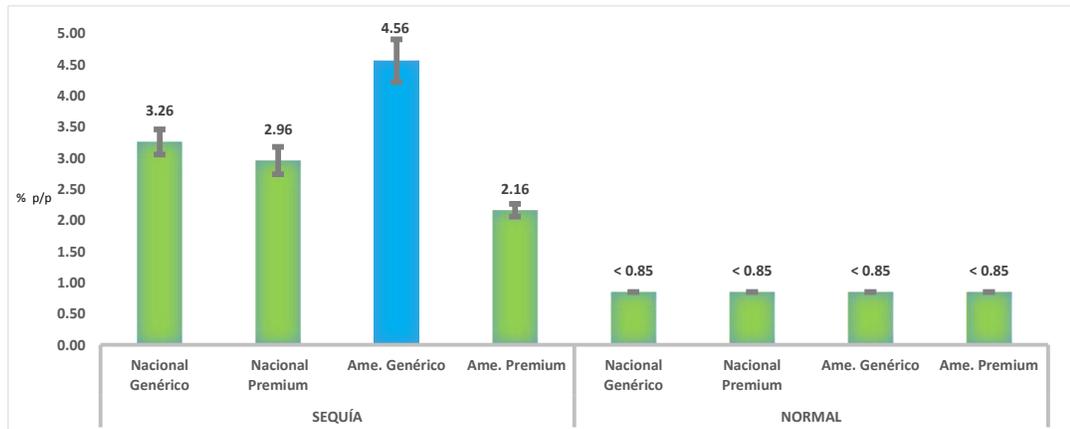


Figura 15. Contenido de Fitoesteroles esterificados en AGDAS de diferente procedencia y grado de calidad por condición de cultivo.

De acuerdo con Fernandes y Cabral (2007), los fitoesteroles libres y esterificados están presentes en aceites comestibles. Con los resultados obtenidos en este estudio se establece que esto también ocurre en AGDAS. Además, los resultados obtenidos muestran que los FE representan un 22% de los fitoesteroles totales (Figura 15). Esto es importante si consideramos el mayor interés de la industria alimentaria por los FE debido a que son más bioactivos, liposolubles y de fácil incorporación en productos grasos de alimentos funcionales (Texeira, 2011). El contenido de FE (4.56 %/pp) fue mayor cuando las condiciones de desarrollo del cultivo se realizó bajo condiciones de sequía.

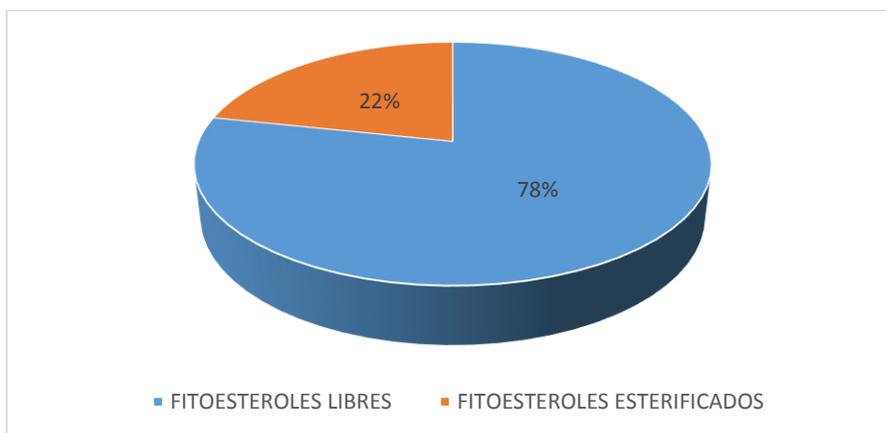


Figura 16. Proporción de fitoesteroles esterificados y libres en AGDAS.

La concentración promedio de escualeno fue de 1.75% p/p (Figura 17). Éste valor se encuentra por debajo del 1.83 % p/p y del 5.5 % p/p reportados en ese orden por Guanawn *et al.* (2007) y Dumont *et al.* (2007). No obstante, es superior al 0.9 % p/p y 1.19 % p/p reportados por Pramparo y Martinello (2005) y Verleyen *et al.* (2001) respectivamente. Estas variaciones pueden ser debidas a factores que propician cambios en la composición de los AGDAS tales como procedencia de la soya, condiciones de cultivo y grado de calidad de aceite a obtener en el proceso de refinación (premium o genérico) (Reden, 2013; Anastasopulus *et al.*, 2011, O'Brien *et al.*, 2011).

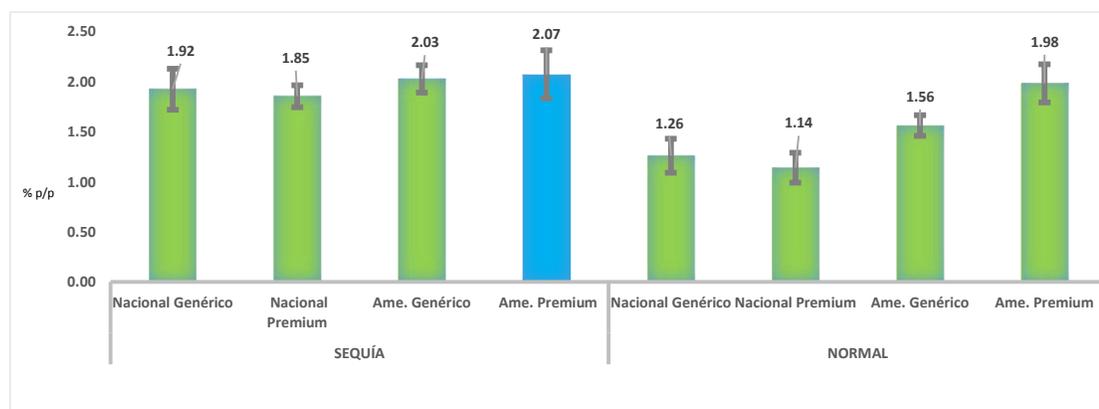


Figura 17. Contenido de escualeno en AGDAS de diferente procedencia, grado de calidad y condición de cultivo.

10.2 Tocoferoles

10.2.1 Validación del método analítico

Los valores obtenidos de los parámetros de validación para δ -Tocoferol, α -Tocoferol y γ -Tocoferol se presentan en la Tabla 19. En el Anexo III se observan los resultados de muestras sintéticas para la validación de tocoferoles. Para el límite de cuantificación del método (LCM) y límite de detección del método (LDM) se obtuvieron rangos de 0.73-1.86 y 0.22-0.56 % p/p respectivamente. Los intervalos de % de exactitud, recuperación, repetibilidad y reproducibilidad fueron de -11.4-11.0, 88.6-111.0, 7.27-9.82 y 10.1-18.1 respectivamente. El % de incertidumbre relativa ± 12.03 -23.0. El rango de trabajo se estableció entre 0.85 y 15 % p/p para las tres formas.

Tabla 19.- Valores en porcentajes de los parámetros de validación para δ -Tocoferol, α -Tocoferol y γ -Tocoferol.

	LCM %p/p	LDM %p/p	Exactitud (sesgo)	Recuperación %	Repetibilidad %	Reproducibilidad %	% de Incertidumbre Relativa	Rango de Trabajo %p/p
δ-Tocoferol	1.86	0.56	11.0	111	9.82	10.15	± 13.58	0.85 - 15.00
α-Tocoferol	2.04	0.48	-0.30	99.7	9.53	18.09	± 23.00	0.85 - 15.00
γ-Tocoferol	0.73	0.22	-11.4	88.6	7.27	10.14	± 12.03	0.85 - 15.00

Actualmente, dentro la normatividad, no existe un método de referencia para este tipo de matriz (AGDAS) con el cual hacer la comparación de los parámetros de validación evaluados en este trabajo. Lo anterior resalta la importancia del mismo, ya que una vez documentados servirán justamente como referencia para posteriores investigaciones en este tipo de muestras. Es importante también resaltar la complejidad de las mismas, ya que los AGDAS son precisamente un concentrado de impurezas, que requiere de procesos de purificación específicos y su consecuente evaluación de la efectividad de los mismos para la certeza de los resultados finales.

10.2.2 Evaluación de la precisión obtenida en condiciones de reproducibilidad

Con respecto a la precisión en condiciones de reproducibilidad Horwitz y Albert (2006), establecieron un procedimiento para su evaluación mediante el coeficiente de Horrat (Ecuación 9). En la práctica los valores de Horrat aceptables oscilan entre 0.5 y 2, los obtenidos para los tres compuestos analizadas están dentro de dicho rango (Tabla 20), por lo que se establece que se logró un método con precisión aceptable en condiciones de reproducibilidad. Con el criterio de algunas referencias de que la reproducibilidad es la fuente que más aporta a la incertidumbre global expandida y en consideración a que en este estudio, de acuerdo al índice de Horrat (Horwitz y Albert, 2006) se obtiene una reproducibilidad aceptable, es posible establecer que la incertidumbre asociada a los resultados de este trabajo está dentro del criterio aceptable.

Tabla 20. Índice de Horrat para cada uno de los compuestos validados

Compuesto	RSDR	PRSDR	HORRAT*
δ -Tocoferol	10.15	9.94	1.02
α - Tocoferol	18.09	10.80	1.68
γ -Tocoferol	10.14	8.58	1.18

*Rango aceptable 0.5 - 2.

RSDR= Precisión en condiciones de reproducibilidad.

PRSDR= Precisión pronosticada HORRAT= Relación de Horwitz

10.2.3 Evaluación de dos modalidades de cuantificación y dos técnicas analíticas para el análisis de tocoferoles

Los análisis estadísticos comparativos mostraron que no existen diferencia significativas entre los métodos de HPLC y GC_MSD ($p < 0.05$; Figura 18), así como entre las modalidades de cuantificación; estándar externo o interno ($p < 0.05$; Figura 19) . Con base en estos resultados se proponen como método de cuantificación y técnica analítica para tocoferoles el uso de GC/MSD con estándar interno. Sin embargo, es importante mencionar que el método más referenciado para el análisis de tocoferoles, en muestras

con alto contenido de grasa, es la cromatografía de líquidos (HPLC) con calibración estándar externo (De Greyt *et al.* 1998, Jiang *et al.*, 2006 y Fang *et al.*, 2007). No obstante, este método presenta las desventajas de que genera gran cantidad de residuales solventes, es menos robusta y requiere de capacitación exhaustiva con respecto a GC/MSD. Por otra parte, Verleyen *et al.* (2001) y Durant *et al.* (2006), refieren el uso de la cromatografía de gases con etapas previas de saponificación y derivatización. Igualmente, existe un reporte en el que utilizan para este análisis la cromatografía de gases con estándar interno y previa saponificación (Saba *et al.*, 2012). Sin embargo, no se documentan parámetros de validación importantes para cualquier metodología analítica como son la incertidumbre, precisión ó exactitud, lo cual limita una comparación.

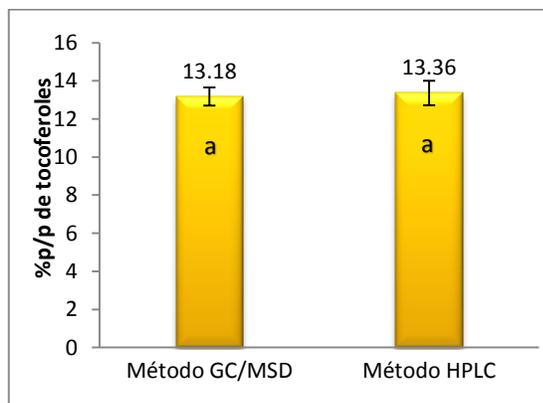


Figura 18. Porcentaje de tocoferoles totales determinados con los métodos GC-MSD y HPLC-UV. Letras iguales sobre las barras significa que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Media de 10 réplicas..

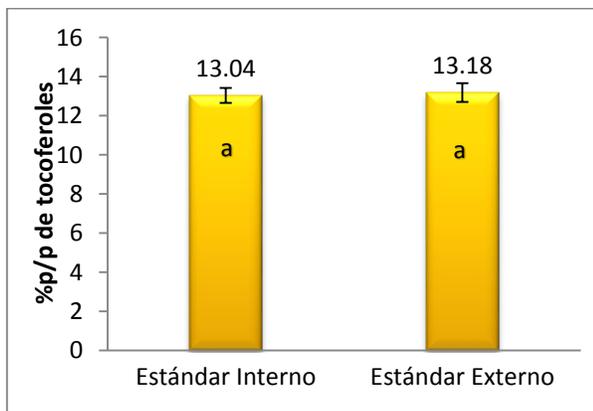


Figura 19. Porcentaje de tocoferoles totales determinados con las modalidades de cuantificación de tocoferoles Estándar Interno (Colesterol) y Estándar Externo (Curva de calibración). Letras iguales sobre las barras significa que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Media de 10 réplicas.

10.2.4 Análisis de AGDAS

La metodología analítica optimizada y validada se aplicó para la cuantificación de tocoferoles en AGDAS provenientes del grado de refinación premium y genérico, americano y nacional, así como cultivado bajo condiciones normales y de sequía. En el Anexo IV se presentan los reportes de Análisis de Tocoferoles. Los valores promedio de cinco réplicas se muestran en la Figura 20.

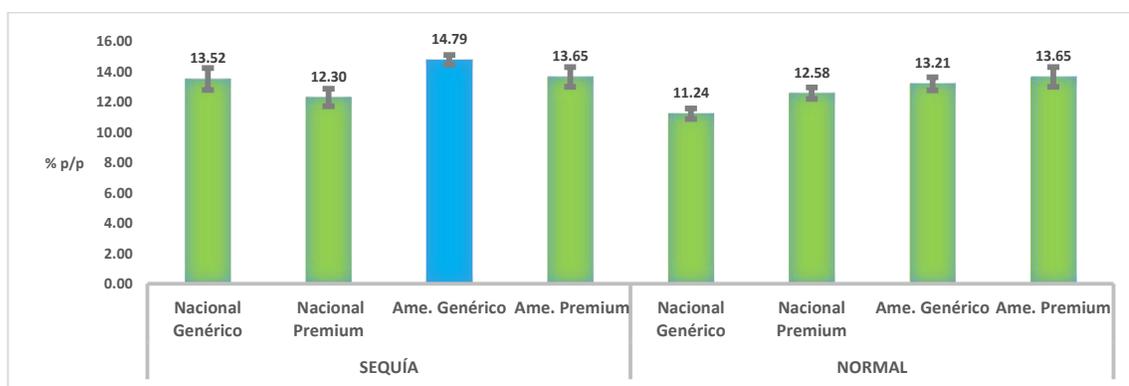


Figura 20. Contenido de tocoferoles en AGDAS de diferente procedencia, grado de calidad y condición de cultivo.

La desodorización es un paso de la refinación del aceite de soya, que elimina los compuestos volátiles responsables del sabor indeseable del aceite, produciendo AGDAS como un subproducto. Sin embargo, este proceso también elimina tocoferoles, por lo que existen reportes que indican que este subproducto podría contener un rango de 10-18.6 % p/p de tocoferoles (Verleyen *et al.*, 2001; Benites, 2005; Ito *et al.*, 2005; Dumont & Suresh, 2007). Por lo cual el contenido de tocoferoles en los AGDAS de estudio (13.12 % p/p) concuerda con la literatura referenciada.

10.3 Plaguicidas

10.3.1 Análisis factorial para la optimización del proceso de purificación de plaguicidas

En la Tabla 21 se muestra los factores que resultaron significativos para cada uno de los plaguicidas evaluados ($p < 0.05$). De estos datos se desprende que el volumen de 9 mL de eluente con el adsorbente Florisil representa la combinación donde se obtuvo la mejor respuesta para la mayoría de los plaguicidas (a excepción del diclorvos). Además se aprecia que no existe interacción entre el volumen de eluente y el adsorbente ($p > 0.05$), por lo que se establece que no hay un efecto combinado entre estos factores para aumentar o disminuir la respuesta. Las gráficas de efectos principales para los 19 plaguicidas evaluados se encuentran en el Anexo V. El Anexo VI muestra los reportes del diseño factorial para plaguicidas.

Tabla 21. Valores de análisis de varianza del diseño factorial para la optimización del proceso de purificación de plaguicidas.

Plaguicida	Valores de Fisher y de p para el modelo	NIVELES		Interacción	Gráfica
		Volumen de eluente (5,9*mL)	Adsorbente (C ₁₈ , Florisil*)		
Endrin	F=12.69, p=0.003	p=0.005, 9	p=0.011, Florisil*	p=0.689	a
Dieldrin	F=11.19, p=0.005	p=0.006, 9	p=0.020, Florisil	p=0.967	b
Heptacloro	F=18.44, p=0.001	p=0.002, 9	p=0.005, Florisil	p=0.306	c
Endosulfan Sulfato	F=2.39, p=0.153	p=0.060, 9	p=0.990, Florisil	p=0.921	d
Diclorvos	F=0.74, p=0.505	p=0.312, 9	p=0.585, C18	p=0.936	e
DDT	F= 9.70, p=0.007	p=0.015, 9	p=0.014, Florisil	p=0.001*	f
Clorpirifus	F=6.61, p=0.020	p=0.25, 9	p=0.046, Florisil	p=0.088	g
β-BHC	F=5.55, p=0.031	p=0.462, 9	p=0.012, Florisil	p=0.095	h
α-BHC	F=6.47, p=0.021	p=0.008, 9	p=0.378, Florisil	p=0.449	i
Aldrin	F=0.66, p=0.544	p=0.287, 9	p=0.908, Florisil	p=0.482	j
DDD	F=4.19, p=0.057	p=0.315, 9	p=0.028, Florisil	p=0.218	k
DDE	F=1.52, p=0.276	p=0.391, 9	p=0.175, Florisil	p=0.605	l
Endosulfan I	F=5.17, p=0.036	p= 0.431, 9	p=0.015, Florisil	p=0.209	m
Endrin Aldehído	F=2.40, p=0.153	p=0.165, 9	p=0.155, Florisil	p=0.576	n
Tetracloro-m-xileno	F=1.13, p=0.369	p=0.184, 9	p=0.711, Florisil	p=0.983	o
δ-BHC	F=6.87, p=0.018	p=0.361, 9	p=0.007, Florisil	p=0.339	p
Endosulfan II	F=7.37, p=0.015	p=0.454, 9	p=0.006, Florisil	p=0.135	q
Endrin Cetona	F= 0.17, p=0.849	p=.706, 9	p=0.682, Florisil	p=0.202	r
Heptacloro Epóxido	F=0.96, p=0.421	p=0.203, 9	p=0.932, Florisil	p=0.701	s

Valor de $p < 0.05$ indica que el factor es significativo. *Nivel del factor donde se obtuvo mayor respuesta.

Las Figuras 21 a-c corresponden a las gráficas de efectos principales, en donde es posible apreciar el efecto de cada factor sobre el % de recuperación de los plaguicidas. Para endrin (Figura 21a) donde ambos factores fueron significativos ($p < 0.05$) se puede observar que el volumen de eluente con 9 mL es donde se obtiene mayor respuesta y para el tipo de adsorbente es con el Florisil.

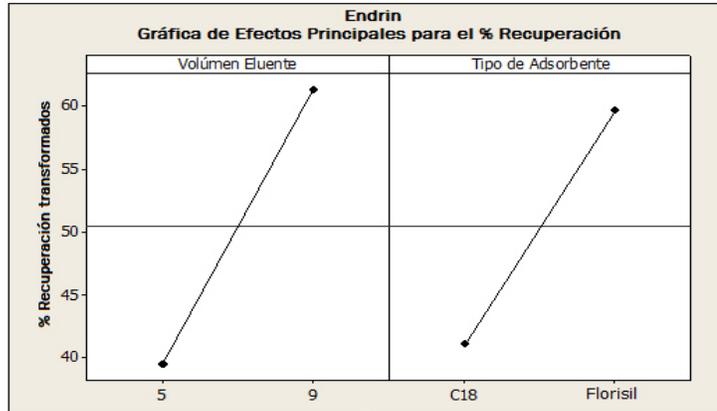


Figura 21a. Grafica de efectos principales para endrin donde se muestra el nivel de cada factor con el que se obtiene mayor porcentaje de recuperación.

En el caso del β -BHC (Figura 21b) el tipo de adsorbente fue significativo (mayor % de recuperación con Florisil). Sin embargo, el volumen de eluyente no fue significativo ($p > 0.05$), en consecuencia, no se observa una diferencia evidente entre el % de recuperación para 5 y 9 mL.

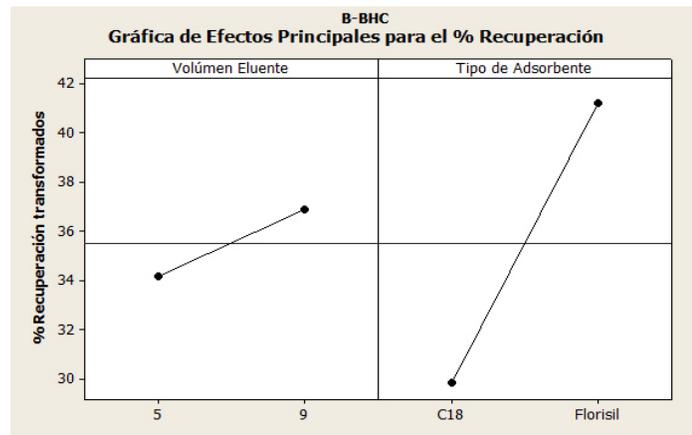


Figura 21b. Grafica de efectos principales para β -BHC donde se muestra el nivel de cada factor con el que se obtiene mayor porcentaje de recuperación.

El diclorvos tuvo un comportamiento diferente a los otros plaguicidas evaluados, siendo el C₁₈ el mejor adsorbente para este, como se puede apreciar en la gráfica de efectos principales (Figura 21 c). Sin embargo, finalmente se decidió trabajar con Florisil, por la mayor respuesta obtenida con todos los demás plaguicidas evaluados.

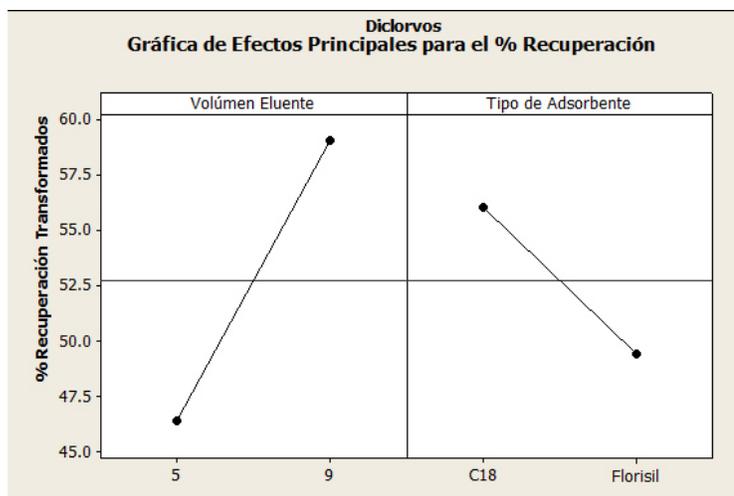


Figura 21c. Gráfica de efectos principales para diclorvos donde se muestra el nivel de cada factor con el que se obtiene mayor porcentaje de recuperación.

10.3.2 Validación para plaguicidas

Los parámetros de validación para los 19 plaguicidas evaluados en este estudio se presentan en la Tabla 22. Para el límite de cuantificación del método (LCM) y límite de detección del método (LDM) se obtuvieron rangos de 0.126 - 0.341 y 0.04 - 0.102 mg/kg respectivamente. Los intervalos de % de exactitud, recuperación, repetibilidad y reproducibilidad fueron de -23.4–16.2, 68.3-109.7, 5.9–15.3 y 5.8-19.1 respectivamente. El porcentaje de incertidumbre relativa $\pm 8.42 - 22.41$. El rango de trabajo se estableció entre 0.05 - 1 mg/kg para los 19 plaguicidas.

Tabla 22. Valores en porcentaje de los parámetros de validación obtenidos para el análisis de plaguicidas.

	LDM mg/L	LCM mg/L	Exactitud	Recuperación	Repetibilidad	Reproducibilidad	Incertidumbre	Rango de Trabajo (mg/kg)
Endrin	0.044	0.147	0.40	100.4		19.1	22.41	0.05-1
Dieldrin	0.055	0.184	-16.1	83.9	7.97	7.7	10.57	0.05-1
Heptacloro	0.040	0.132	2.2	102.2	8.15	8.2	10.26	0.05-1
Endosulfan Sulfato	0.051	0.170	16.2	116.2	9.09	12.1	14.92	0.05-1
Diclorvos	0.102	0.341	-15.2	84.8	11.11	10.9	16.18	0.05-1
DDT	0.056	0.186	-10.0	90.0	7.91	8.0	10.84	0.05-1
Clorpirifus	0.077	0.257	11.0	111.0	8.13	7.8	11.78	0.05-1
α -BHC	0.061	0.203	3.3	103.3	8.85	11.9	15.06	0.05-1
Aldrin	0.053	0.176	-17.1	82.9	5.66	5.8	8.67	0.05-1
Malation	0.052	0.174	-3.7	96.3	11.34	15.3	18.47	0.05-1
DDE	0.058	0.192	-20.3	79.7	6.80	6.6	9.63	0.05-1
Endosulfan I	0.060	0.199	-10.3	89.7	6.38	6.3	9.41	0.05-1
Endrin Aldehído	0.067	0.224	-31.7	68.3	11.11	10.8	14.10	0.05-1
δ -BHC	0.062	0.207	1	101.0	7.15	7.0	10.45	0.05-1
Endosulfan II	0.060	0.201	7.6	107.6	5.72	5.9	9.17	0.05-1
Endrin Cetona	0.038	0.126	9.7	109.7	8.13	7.9	10.09	0.05-1
Heptacloro Epóxido	0.057	0.190	-23.4	76.6	6.58	6.6	9.60	0.05-1
Lindano	0.076	0.253	-10.9	89.1	6.37	6.9	11.09	0.05-1
Metil paration	0.039	0.131	-3.7	96.3	4.00	9.0	11.30	0.05-1

10.3.3 Evaluación de la precisión obtenida en condiciones de reproducibilidad

La precisión encontrada mediante el coeficiente de Horrat (Ecuación 9) se muestran en la Tabla 23. En la práctica los resultados de Horrat aceptables oscilan entre 0.5 y 2.16, por lo que, considerando que los valores obtenidos están dentro de dicho rango, se puede establecer que se obtuvo un método con precisión en condiciones de reproducibilidad aceptable.

Tabla 23. Índice de Horrat para cada uno de los compuestos validados

	RSDR	PRSDR	HORRATr
Aldrin	5.80	20.12	0.29
Diclorvos	11.32	20.05	0.56
α-BHC	12.02	19.47	0.62
Lindano	6.73	19.90	0.34
Heptacloro Epoxido	6.81	20.36	0.33
Clorpirifos	7.91	19.25	0.41
Metil Paration	9.13	19.67	0.46
Malation	15.35	19.67	0.78
δ - BHC	7.11	19.52	0.36
Heptacloro	8.24	19.50	0.42
Endosulfan I	6.25	19.88	0.31
DDE	6.53	20.24	0.32
Dieldrin	7.62	20.08	0.38
Endrin	19.12	19.55	0.98
Endosulfan II	5.95	19.34	0.31
DDT	8.00	19.87	0.40
Endrin Aldehido	10.53	20.71	0.51
Endosulfan Sulfato	12.07	19.13	0.63
Endrin Cetona	8.03	19.29	0.42

*Rango aceptable 0.5 - 2. RSDR= Precisión en condiciones de reproducibilidad.
PRSDR= Precisión pronosticada HORRAT= Relación de Horwitz

10.3.4 Análisis de plaguicidas en AGDAS

En los cromatogramas obtenidos (Figura 22) se observó la presencia de una señal con un tiempo de retención de 12.343 min, que en el reporte cuantitativo se identificó como malatión (Figura 23). Sin embargo, la prueba confirmatoria demostró la ausencia de dicho plaguicida, ya que en esta última no existió concordancia entre los tiempos de retención del estándar de malatión (en color azul) y la interferencia (en color rojo) como se aprecia en la Figura 24.

En el Anexo 7 se muestran reportes de análisis de plaguicidas.

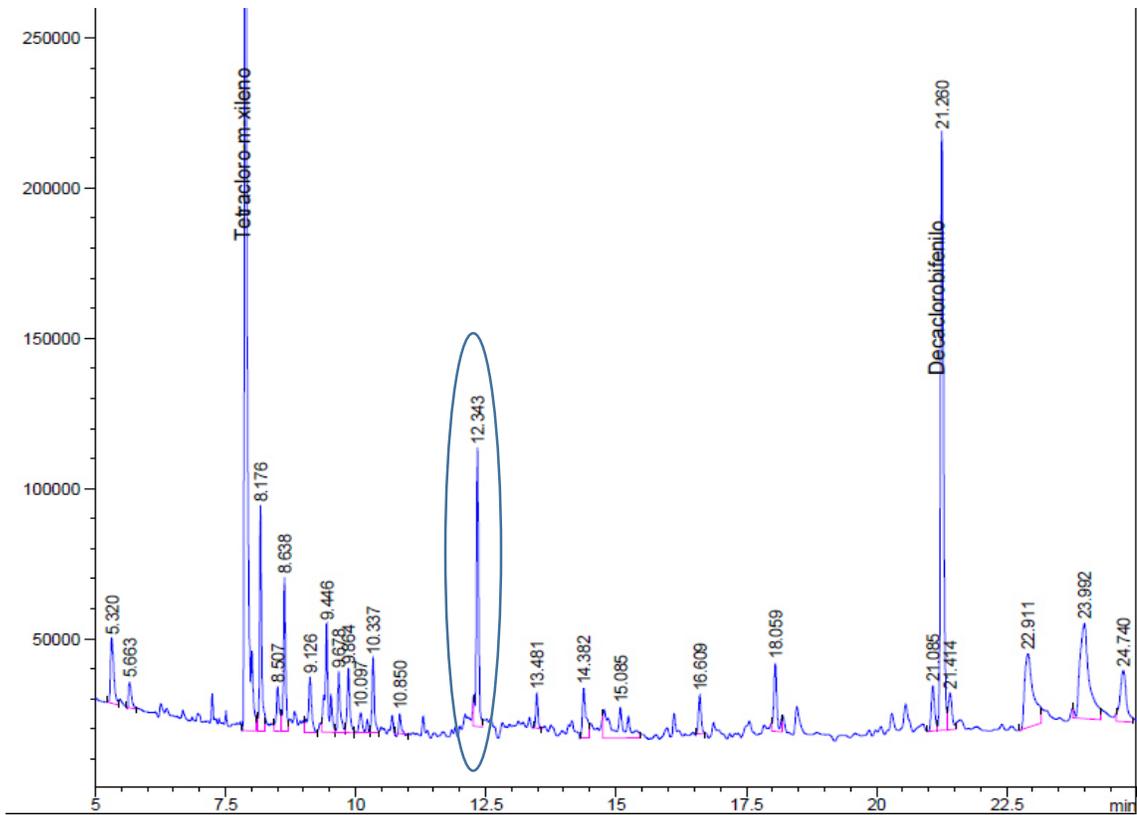


Figura 22. Cromatograma de plaguicidas para el análisis cuantitativo de AGDAS.

Data File D:\NFCHEM\2\DATA\MAY0713\017P1101.D Sample Name: Mta-09

External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 4/9/13 7:16:48 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
6.103						
7.882	PV	1.36516e6	2.52486e-7	3.44683e-1		Di-clorvos.
9.447	VV	1.08212e5	5.18253e-7	5.60811e-2		Tetra-cloro-m-Xileno
10.226	VP	1.03219e4	2.73377e-6	2.82176e-2		alfa-BHC
10.704	BP	1.93353e4	3.18746e-6	6.16307e-2		Lindano
11.299	PB	1.84669e4	0.00000	0.00000		Hepta-cloro
11.920	BP	9210.97852	0.00000	0.00000		Aldrin
12.273	PV	2.25047e4	2.73977e-6	6.16577e-2		Clorpirifos
12.346	VP	2.59739e5	7.39407e-6	1.92053		Metil Paration
12.437						Malation
12.825						Delta-BHC
13.486	PB	3.39391e4	0.00000	0.00000		Hepta-cloro Epox.
13.934						Endosulfan I.
14.386	PB	7.45241e4	0.00000	0.00000		DDE
14.780	PB	6.32010e4	1.62727e-6	1.02845e-1		Dieldrin
15.953						Endrin
16.121	PB	2.59468e4	0.00000	0.00000		Endosulfan II
17.214						DDT
18.064	BV	8.23069e4	8.74771e-7	7.19998e-2		Endrin Aldehido
19.101						Endosulfan Sulfato
21.264	VV	8.75920e5	4.10189e-7	3.59293e-1		Endrin Cetona
						Decaclorobifenilo
Totals :				3.00693		

Figura 23. Reporte del análisis cuantitativo de plaguicidas en AGDAS.

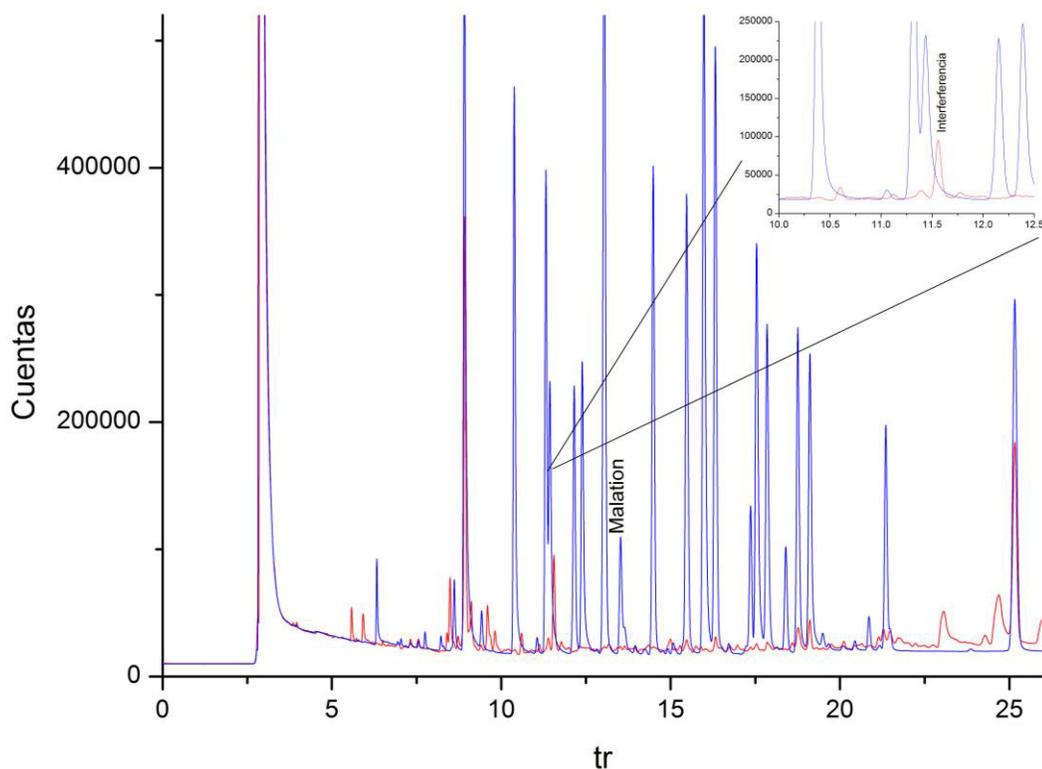


Figura 24. Contraste entre el cromatograma de un estándar de plaguicidas y las muestras. Estándar de malatión en color azul y la interferencia en color rojo.

Una vez descartada la presencia de malatión, se pudo establecer que la concentración de los 19 plaguicidas analizados en las muestras analizadas de AGDAS de procedencia americana o nacional, con grado de refinación premium o genérico y cultivado en ciclo con condiciones de cultivo normal o sequía, se encuentran por debajo de los límites de cuantificación del método que está dentro del rango de 0.126-0.341 mg/kg (Tabla 24). Estos valores resultantes, no pueden ser evaluados con respecto a normatividad oficial vigente ya que no existen normas nacionales o internacionales para este subproducto.

Tabla 24. Concentración de los 19 plaguicidas analizados en AGDAS

PLAGUICIDA	CONCENTRACION (mg/kg)	PLAGUICIDA	CONCENTRACION (mg/kg)
Endrin	< 0.147	Endosulfan I	< 0.199
Dieldrin	< 0.184	Endrin Aldehído	< 0.224
Heptacloro	< 0.132	δ -BHC	< 0.207
Endosulfan Sulfato	< 0.170	Endosulfan II	< 0.201
Diclorvos	< 0.341	Endrin Cetona	< 0.126
DDT	< 0.186	Heptacloro Epóxido	< 0.190
Clorpirifus	< 0.257	Lindano	< 0.253
α-BHC	< 0.203	Metil paratión	< 0.131
Aldrin	< 0.176	Malatión	< 0.174
DDE	< 0.192		

10.4 Evaluación de la influencia de los factores analizados en la composición de AGDAS

10.4.1 Fitoesteroides

En el contenido de fitoesteroides totales de los AGDAS, no fueron determinantes los factores de procedencia, grado de calidad o condición de cultivo, de acuerdo al ANOVA multifactorial ($p > 0.05$) y la gráfica de efectos principales (Figura 25). Al respecto, Vlahakis *et al.* (2000), reportan que las altas temperaturas y la localización del cultivo fueron significativos para el incremento de los niveles de fitoesteroides en semilla de soya.

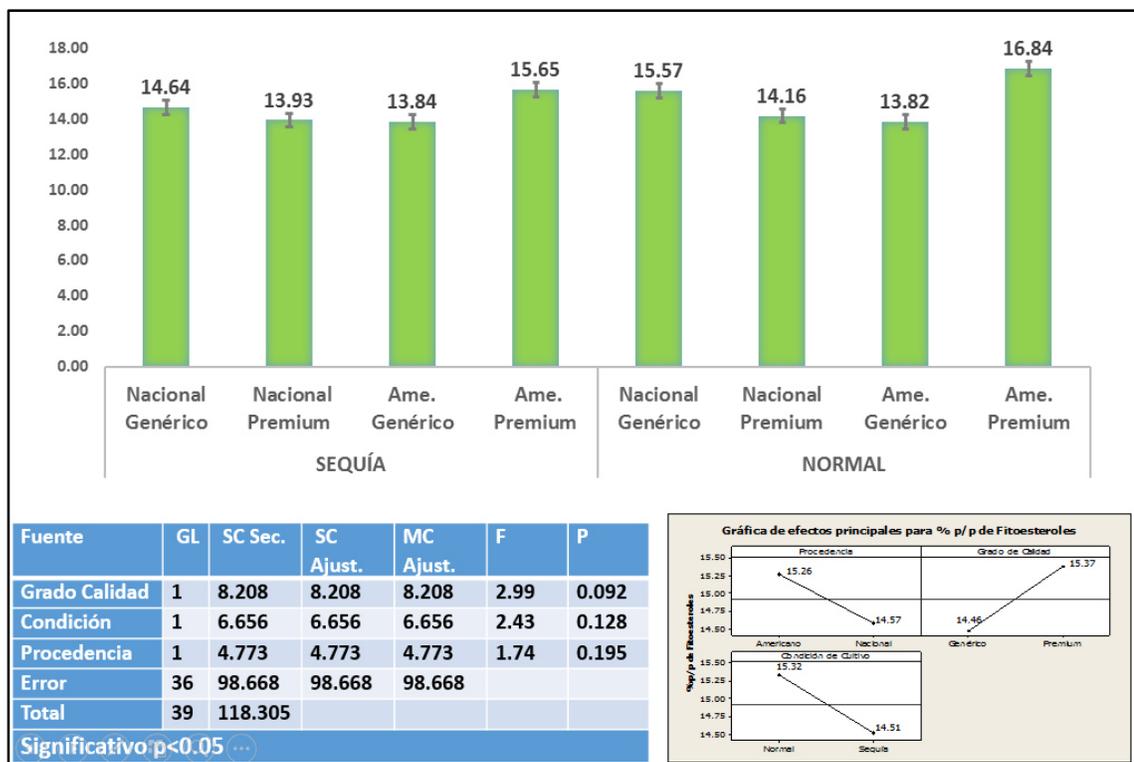


Figura 25. Gráfica de barras de los valores encontrados en el análisis de fitoesteroles totales en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y gráfica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos. El valor que se muestra en las barras corresponde a un promedio de 5 réplicas.

Sin embargo, en el contenido de fitoesteroles esterificados, los factores grado de calidad y condición de cultivo influenciaron el contenido de estos compuestos, como se puede apreciar en el ANOVA multifactorial ($p < 0.05$) y gráfica de efectos principales (Figura 26). Moreau *et al.* (2002), reportan que la interconversión de fitoesteroles libres a esterificados es muy rápida, lo que sugiere una función regulatoria a cambios en niveles de fitohormonas y a factores ambientales como luz, temperatura y estrés de hídrico. Estas modificaciones en la forma de los fitoesteroles están involucradas en cambios en propiedades de la membrana como respuesta condiciones de estrés. Incluso, ha sido reportado que los niveles de fitoesteroles esterificados se incrementan con la senescencia y como respuesta a estrés fisiológico (Wen *et al.*, 2008). Así mismo, con respecto al grado de calidad, O'Brien (2000), refiere que las condiciones de temperatura, presión y tiempo de residencia en la etapa de blanqueo y deodorizador influyen en la composición de los FE en AGDAS.

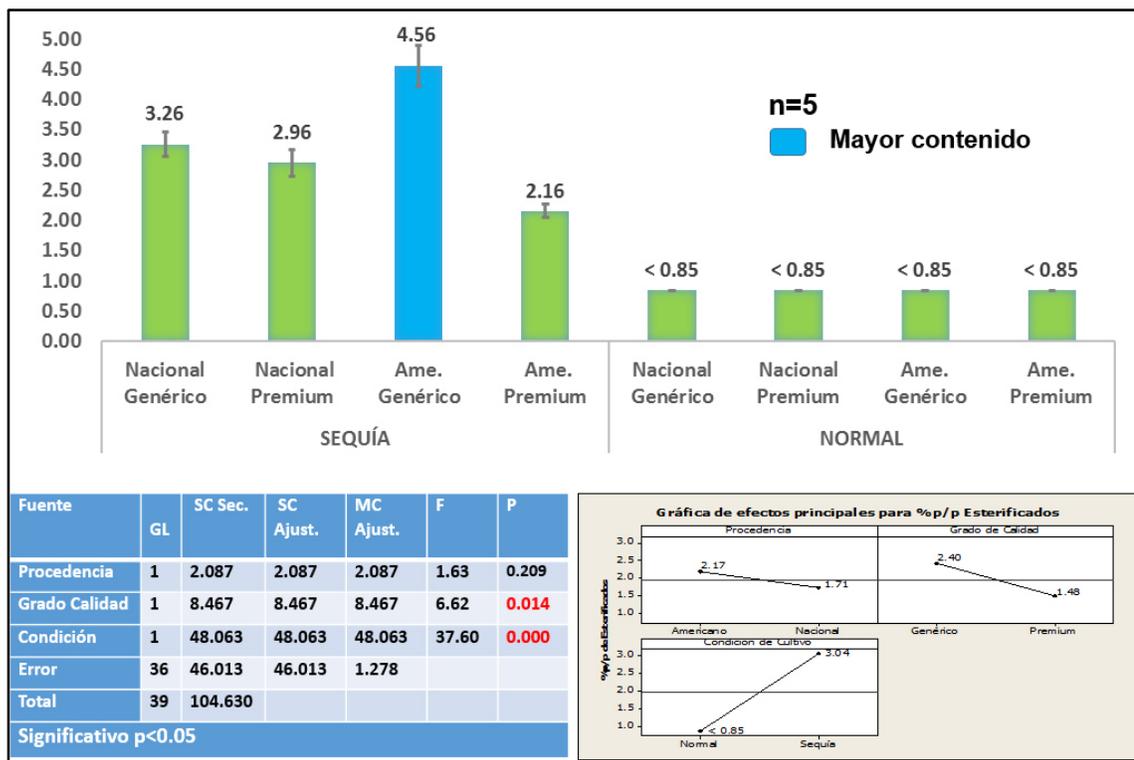


Figura 26. Gráfica de barras de los valores encontrados en el análisis de fitoesteroles esterificados en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y gráfica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos. El valor que se muestra en las barras corresponde a un promedio de 5 réplicas.

10.4.2 Escualeno

Para el caso del escualeno, los factores procedencia y condición de cultivo influenciaron el contenido de estos compuestos, como se puede apreciar en el ANOVA multifactorial ($p < 0.05$) y gráfica de efectos principales (Figura 27). En concordancia con diferentes autores, el contenido de tocoferoles, fitoesteroles y escualeno en algunos cultivos, depende de las condiciones climáticas así como de la genética de la especie (Singh *et al.*, 2013; INIFAP 2012; Anastasopoulos *et al.*, 2011; Britz *et al.*, 2007).

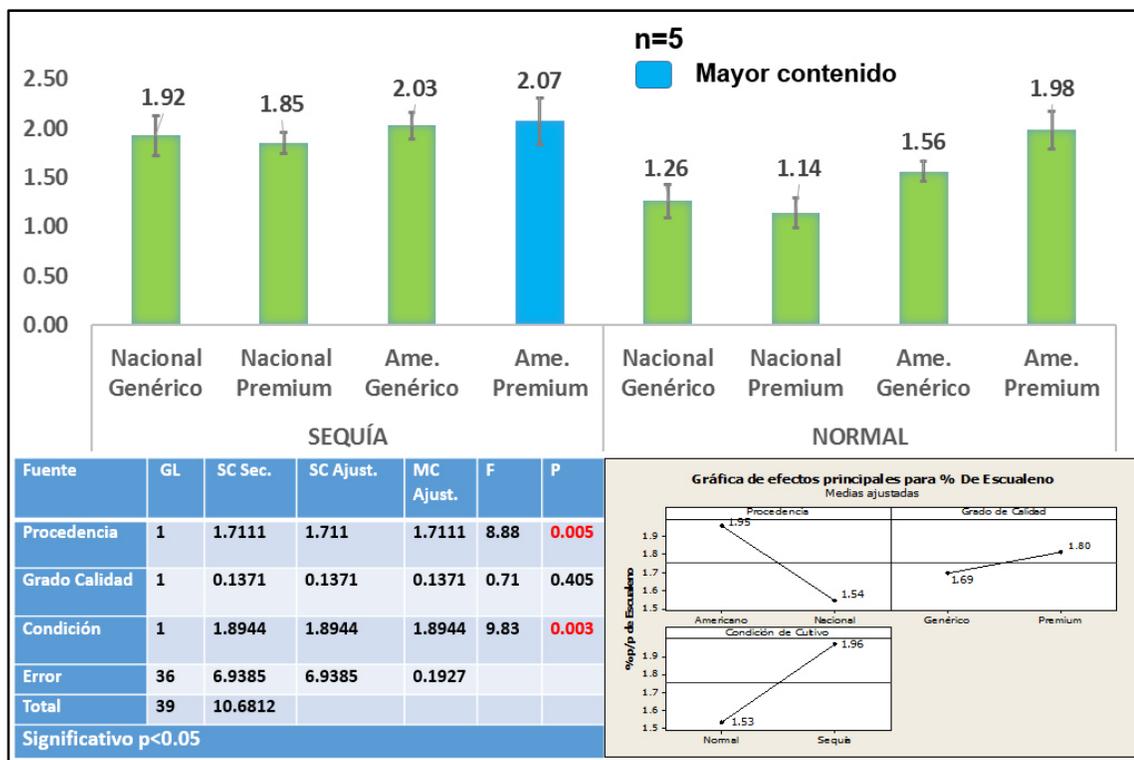


Figura 27. Gráfica de barras de los valores encontrados en el análisis de escualeno en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y gráfica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos. El valor que se muestra en las barras corresponde a un promedio de 5 réplicas.

10.4.3 Tocoferoles

En el contenido de tocoferoles, la procedencia y la condición de cultivo fueron determinantes en el contenido de estos compuestos en los AGDAS, de acuerdo al ANOVA multifactorial ($p < 0.05$) y la gráfica de efectos principales (Figura 28). Es posible observar que el mayor valor para tocoferoles se presenta en la condición de sequía y, de acuerdo con Udaondo (2011) y Britz *et al.* (2002), en plantas resistentes a la sequía se puede producir un aumento neto de los niveles de tocoferol como respuesta a esta condición de estrés.

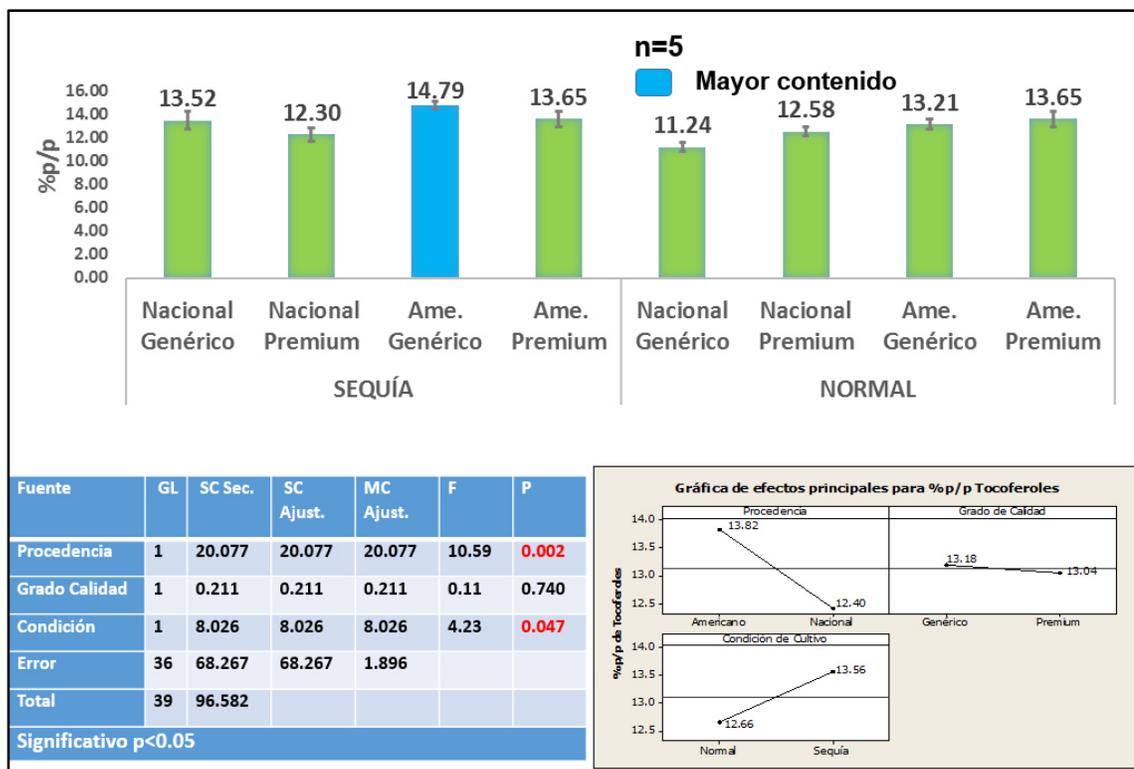


Figura 28. Grafica de barras de los valores encontrados en el análisis de tocoferoles en AGDAS con el correspondiente ANOVA multifactorial y grafica de efectos principales para la evaluación de la influencia de la procedencia, grado de calidad y condición de cultivo en el contenido de estos compuestos. El valor que se muestra en las barras corresponde a un promedio de 5 réplicas.

10.4.4 Plaguicidas

Para plaguicidas se establece que ninguno de los factores evaluados fue determinante en la concentración de éstos, dado que los valores del análisis de AGDAS resultaron menores a los límites de cuantificación del método (Tabla 24). Duijn (2008), reporta que la inocuidad del aceite está asegurada en términos de plaguicidas por efecto del proceso de refinación, ya que el nivel de éstos en el aceite refinado está por debajo del LMR (Límite máximo residual). En consecuencia, el deodorizado es el destino final de los plaguicidas que no fueron eliminado en las etapas anteriores, en caso de que la semilla los haya contenido en niveles por encima de dicho límite. Lo anterior indica que el encontrar concentraciones menores al límite de cuantificación en AGDAS refleja el uso de las buenas prácticas agrícolas a nivel de precosecha tanto para grano nacional como para americano.

11.0 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en ésta investigación, es posible concluir que el aprovechamiento del subproducto de la etapa de deodorización del aceite de soya, es factible. Lo anterior, al considerar que el contenido de tocoferoles y fitoesteroles superan el 10%, a pesar de que el escualeno resultó menor al 5 %. El contenido de escualeno y tocoferoles en AGDAS son afectados por factores como la procedencia y la condición de cultivo, cuya concentración promedio varía de 1.75 y 13.12 % p/p respectivamente. Estos factores además del grado de calidad no son determinantes en el contenido de fitoesteroles totales en los AGDAS, cuya concentración promedio fue de 14.92 % p/p. No obstante, la proporción de fitoesteroles esterificados (4.9%) está relacionada con el grado de calidad y la condición del cultivo, pero no con la procedencia.

Por otro lado la concentración de los plaguicidas analizados en AGDAS, obtenidos de cultivo de soya de diferente procedencia, grado de calidad y condición de cultivo, se encontró por debajo de los límites de cuantificación del método que está dentro del rango de 0.126-0.341 mg/kg.

Finalmente, las metodologías que se establecieron de preparación y análisis de fitoesteroles, tocoferoles, escualeno y plaguicidas, representan una innovación viable para la disminución de costos, tiempo y generación de residuos peligrosos, y se documentaron sus parámetros de validación

12.0 PERSPECTIVAS

Con la metodología establecida en esta investigación, la industria de extracción y refinación de aceite vegetal estará en condiciones de ofrecer el aseguramiento de la calidad del subproducto denominado AGDAS (ácidos grasos destilados de aceite de soya) y ofertarlo con el verdadero valor comercial en base al contenido de sustancias bioactivas, como un producto estandarizado.

Dicha metodología optimizada y validada, se podrá aplicar en la industria para el aseguramiento de la calidad del subproducto en estudio. Lo cual le permitirá cumplir con los protocolos de calidad y veracidad de resultados que establece la NMX EC-17025-IMNC ante la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). La cual contiene los requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y de calibración que desean demostrar que poseen un sistema de gestión, son técnicamente competentes y además que son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

Ya que en base a la presente investigación se estableció que AGDAS es un subproducto factible de ser aprovechado, resulta necesario proponer la investigación para estandarizar protocolos de purificación de los compuestos bioactivos presentes, considerando las concentraciones en el rango de los valores referenciados.

Si bien fue establecido un protocolo de purificación para el análisis de plaguicidas en AGDAS, es necesario vincularlo con instrumentos analíticos de mayor sensibilidad para de esta manera obtener límites de detección por debajo de los reportados en este estudio.

Adicionalmente, la metodología optimizada y validada resultado de este estudio, puede ser aplicada también, para el análisis de la calidad y originalidad de los aceites vegetales en la industria alimentaria.

13.0 BIBLIOGRAFÍA

Albanil EA, Ramírez RP. 2011. Reporte del clima en México. Comisión Nacional del Agua. Servicio Meteorológico Nacional. Gerencia de Meteorología y climatología. 1(8):7-9.

Almeida BM, Erthal RS, Padua EO, Silveira LV, Amelia LE. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965–977.

Amvrazi EG, Albanis TA. 2006. Multiresidue method for determination of 35 pesticides in virgin olive oil by using liquid-liquid extraction techniques couples with solid-phase extraction clean up and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection and electron capture detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9642-9651.

Aguilera Y, Dorado ME, Prada FA, Martinez JJ, Quesada A, Ruiz-Gutierrez V. 2005. The protective role of squalene in alcohol damage in the chick embryo retina. *Experimental Eye Research* 80:535–543.

Anastasopoulos E, Kalogeropoulos N, Kaliora AC, Kountouri A, Andrikopoulos NK. 2011. The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. *International Journal of Food and Science Technology* 46: 170–178.

Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86:412-431.

AOCS. 2009. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 6th Edition, second printing, AOCS: Champaign, Ce 3-74.

Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF, Brochard P. 2003. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *American Journal of Epidemiology* 157:409-414.

Benites CI, Reis SM, Oliveira AO. 2005. Avaliação de métodos de neutralização do destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS). In: II Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras, Florianópolis, SC. Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras. 25-28

Borher JRZ, Gonçalves LAG, Felício PE. 2002. α - and γ -tocopherol levels in Nelore steer blood plasma after a single oral treatment of soybean oil deodorizer distillate (SODD). *Meat Science*, Oxford 61:301-306.

Breinhölder P, Mosca L, Lindner W. 2002. Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *Journal of Chromatography B* 777:67–82.

Britz SJ, Kremer DF. 2002. Warm temperatures or drought during seed maturation increase free α -tocopherol in seeds of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6058–6063.

Britz SJ, Prasad PV, Moreau RA, Allen LH Jr, Kremer DF, Boote KJ. 2007. Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol in brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7559–65.

Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirlini M, Bruni R. 2010. Characterization of a potential nutraceutical ingredient: pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods for Human Nutrition* 65:277–283.

Chan P, TomLinson B, Lee CB, Lee YS. 1996. Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Pharmacology* 36:422–427.

Chamkasem N, Ollis L, Harmon T, Lee S, Mercer G. 2013. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified Quechers method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:2315–2329.

Chaudry MM, Nelson A, Perkins EG. 1976. Distribution of aldrin and dieldrin in soybeans, oil, and by-products during processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 53:695–697.

Chaudry MM, Nelson AI, Perkins EG. 1978. Distribution of chlorinated pesticides in soybeans, soybean oil, and its by-products during processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 55:851–853.

Costa J, Amaral JS, Mafra I, Oliveira MB. 2011. Refining of Roundup Ready® soya bean oil: Effect on the fatty acid, phytosterol and tocopherol profiles. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113:528–535.

Constantinou C, Papas A, Constantinou AI. 2008. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. *International Journal of Cancer* 123:739–752.

Cunha SC, Lehotay SJ, Mastovska K, Fernandes JO, Oliveira M. 2007. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science* 30:620–632

Dagat D. 2000. Phytoesterols: highly promising compounds. *Lipid Technology* 12:77-84 Comité Nacional Sistema Producto Oleaginosa. (Consultado el 16 de enero de 2012)

De Greyt WF, Petrauskaite V, Kellens MJ, Huyghebaert AD. 1998. Analysis of tocopherols by gas-liquid and high-performance liquid chromatography: A comparative study. *Fett-Lipid* 100:503-507

De Greyt W, Kellens M, 2000. Refining practice. In: *Edible Oil Processing*. Hamm W., Hamilton R. J. ed. Danvers: Blackwell. pp. 281.

Douwes JP, Thorne N, Pearce, D Heederik. 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: Progress and prospects. *Annals of Occupational Hygiene* 47:187-200.

Diario Oficial de la Federación 15 de octubre de 1987. Decreto que establece las Bases de Coordinación que las Secretarías de Comercio y Fomento Industrial; de Agricultura y Recursos Hidráulicos; de Desarrollo Urbano y Ecología, y de Salud, deberán observar en relación con plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=2055986.

Duijn G. 2008. Industrial experiences with pesticide removal during edible oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110:982-989

Dumont MJ, Suresh SN. 2007. Characterization of flax and soybean soapstocks, and soybean deodorizer distillate by GC-FID. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84:1101-1105.

Durant AA, Dumont MJ, Narine SS. 2006. In situ silylation for the multicomponent analysis of canola oil by-products by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 559:227-233.

US-EPA METHOD 8081A. Revisión 2, 2007. Organochlorine pesticides by gas chromatography.

Department Environmental Protection Agency 40 CFR Part 122, 136, 2007. Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants Under the Clean Water Act; National Primary Drinking Water Regulations; and National Secondary Drinking Water Regulations; Analysis and Sampling Procedures; Final rule. pp 11213-11239.

Erickson DR, 1995. *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*. American Oil Chemists' Society Press: Champaign, IL, pp. 239.

- Fang T, Goto M, Wang X, Ding X, Geng J, Sasakia M, Tsutomu H. 2007. Separation of natural tocopherols from soybean oil byproduct with supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 40:50–58
- Fernandes P, Cabral JMS. 2007. Phytosterols: Applications and recovery methods Review. *Bioresource Technology* 98:2335–2350
- Financiera Rural. 2013. Semilla para Siembra de Soya. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial.
- Firestone D. 2006. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 6th ed. The American Oil Chemists' Society Press: Urbana, IL, Cd 23-93
- Garrido FA, Fernández MJL, Martínez VJL, Arrebola LFJ. 2007. Application of gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for the multiresidue analysis of pesticides in olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:8346–8352.
- González AG, Herrador MA. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry* 26:227-238
- González-Larena M, Cilla A, García-Llatas G, Reyes B, Lagarda MJ. 2012. Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: Storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:4725-4734.
- Guan H, Brewer WE, Morgan SLJ. 2009. New approach to multiresidue pesticide determination in foods with high fat content using disposable pipette extraction (DPX) and gas chromatography –mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:10531–10538.
- Gunawan S, Kasim NS, Ju Y-H. 2008. Separation and purification of squalene from soybean oil deodorizer distillate. *Separation and Purification Technology* 60: 128–135
- Haas MJ, Bloomer S, Scott K. 2000. Simple, high-efficiency synthesis of fatty acid methyl esters from soapstock. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77:373–379.
- Haas MJ, Michalski PJ, Runyon S, Nunez A, Scott KM. 2003. Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80:97–102.

Haas MJ, Scott KM. 1996. Combined nonenzymatic-enzymatic method for the synthesis of simple alkyl fatty acid esters from soapstock. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73:1393–1401.

Harvey D. 2002. *Química Analítica Moderna*. McGraw Hill. pp. 44-68.

Haojun Y, Feng Y, Daogeng W, Ming H, Jianxin L, Cao Y, Jiang Y. 2010. Recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate. *Bioresource Technology* 101:1471-1476.

He HP, Corke H. 2003. Oil and squalene in amaranthus grain and leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7913–7920

He Z, Wang L, Peng Y, Luo M, Wang W, Liu X. 2014. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography–tandem mass spectrometry-based method. *Food Chem* 169:372–380

Hovenkamp E, Demonty I, Plat J, Lutjohann D, Mensink RP, Trautwein EA. 2008. Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research* 47:37-49.

Horwitz W, Albert RJ, 2006. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, 89:1095-1109.

Hrouzková S, Matisová E, Stoytcheva M. 2011. Fast Gas Chromatography and Its Use in Pesticide Residues Analysis. In: *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*. InTech: Croatia, pp. 131-154.

Ito V, Martins P, Batistella CB, Wolf MMR. 2005. Tocopherols and phytosterols concentration from soybean oil deodorizer distillate. In: *Fourth Mercosur Congress on process systems engineering and 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering*, Rio de Janeiro, Brazil. 1–9.

Jiang ST, Shao P, Pan LJ, Zhao YY. 2006. Molecular distillation for recovering tocopherol and fatty acid methyl esters from rapeseed oil deodoriser distillate. *Biosystems Engineering* 93:383–391

Jimeno-Diestro, G. 2008. *Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente*. Ed. Anaya Educación: España

Khatoon S, Raja-Rajan RG, Gopala-Krishna AG. 2009. Physicochemical characteristics and composition of Indian soybean oil deodorizer distillate and the recovery of phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87:321-326.

Kodba ZC, Voncina DB. 2007. A rapid method for the determination of organochlorine, pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in fatty foods using GC with electron capture detection. *Chromatographia* 66:619–624

Kirchman H, Bergström L, Kätterer T, Mattsson L, Gesslein, S. 2007. Comparison of long-term organic and conventional crop-livestock system previously nutrient-depleted soil in Sweden. *Agronomy Journal* 99:960-972.

Kochhar SP. 2000. Stable and healthful frying oil for the 21st century. *Inform.* 11:642–647.

Kumirska J, Migowska N, Caban M, Plenis A, Stepnowski P. 2011. Chemometric analysis for optimizing derivatization in gas chromatography-based procedures. *Journal of Chemometrics* 25:636-643.

Lázaro R, 1995. Comparación de dos técnicas de extracción de materia grasa para la determinación de residuos organoclorados en alimentos. *Grasas y Aceites* 48:35-38

Lee HJ, Ju J, Paul S, So JY, DeCastro A, Smolarek A, Lee MJ, Yang CS, Newmark HL, Suh N. 2009. Mixed tocopherols prevent mammary tumorigenesis by inhibiting estrogen action and activating PPAR-gamma. *Clinical Cancer Research* 15:4242–4249.

Lehotay SJ, Mastovská K, Yun SJ. 2005. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International* 88:630–638.

Lin DL, Wang SM, Wu CH, Chen BG, Liu RH. 2008. Chemical derivatization for the analysis of drugs by GC- MS — A conceptual review. *Journal of Food and Drug Analysis* 16:1-1

Loffredo CA, Silbergeld EK, Ferencz C, Zhang J. 2001. Association of transposition of great arteries in infants with maternal exposures to herbicides and rodenticides. *American Journal of Epidemiology* 153:529-536.

López CL, Gallardo MA. 2001. Efectos en la salud de las exposiciones agudas y crónicas a los plaguicidas. En: *Daños a la salud por plaguicidas*. Editorial El Manual Moderno: México, D.F, pp. 61-74.

Lopez M, Crespi M. 2000. Revisión de los métodos de extracción y purificación de plaguicidas de muestras con alto contenido de material grasa. *Grasas y Aceites* 51:183-189.

Ling WH, Jones PJH. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences* 57:195–206.

Makhal S, Mandal S, Kanawjia SK. 2006. Phytosterols and stanols: the new age in designing novel functional dairy foods. *Indian Food Industry* 25:44–53.

Maroto A, Ricard B, Jordi R, Xavier R. 2002. Estrategias para el cálculo de la Incertidumbre. *Técnicas de Laboratorio*. 270:223-227.

Martins PF, Batistella CB, Maciel-Filho R, Wolf-Maciel MR. 2006a. Comparison of two different strategies for tocopherols enrichment using a molecular distillation process. *Industrial and Engineering Chemistry Research, Washington*. 45:753–758.

Martins PF, Ito VM, Batistella CB, Maciel MRW. 2006b. Free fatty acid separation from vegetable oil deodorizer distillate using a molecular distillation process. *Separation and Purification Technology* 48:78–84.

Matthäus B, Brühl L. 2001. Comparison of different methods for the determination of the oil content in oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78:95-102.

Meijer GW. 1999. Blood cholesterol-lowering plant sterols, types, doses and forms. *Lipid Technology* 11:129–132.

Mendes MF, Pessoa FLP, Coelho GV, Uller AMC. 2005. Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids* 34:157–162

Mendes MF, Pessoa FLP, Uller AMC. 2002. An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids* 23:257–265.

Mills PK, Yang R. 2003. Prostate cancer risk in California farm workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 45:249-258.

Miyahara M, Saito Y. 1993. Pesticide removal efficiencies of soybean oil refining processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:731-734.

Moraes CMB, Oliveira AC, Rios KR. 2004. Vitamina E do destilado da desodorização do óleo de soja e sob forma de fármaco na prevenção à oxidação dos lípidos e da necrose hepática decorrente de dieta deficiente em cistina para ratos. En: XVIII Congresso Brasileiro de Nutrição. Campo Grande. Anais. Campo Grande: ASBRAN. 198.

Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research* 41:457–500.

Nacional Pesticide Information. 2013. Regulación internacional de Pesticidas. Nacional Pesticide Information, [Online] Disponible en : <http://npic.orst.edu/reg/intreg.es.html>

Nagao T, Kobayashi T, Hirota Y, Kitano M, Kishimoto C, Fujita T, Watanabe Y, Shimada Y. 2005. Improvement of a process for purification of tocopherols and sterols from soybean oil deodorizer distillate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 37:56–62.

Naz S, Sherazi STH, Talpur FN, Talpur MY, Kara H. 2012. Determination of Unsaponifiable Constituents of Deodorizer Distillates by GC-MS. *Journal of the American Chemical Society* 89:973-977.

Nguyen TD, Lee MH, Lee GH. 2010. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid–liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal* 95:113–119.

NMX EC-17025-IMNC. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. (ISO/IEC 17025:2005/Cor. 1:2006)

O'Brien RD, Farr WE, Wan PJ. 2000. Introduction to fats and oils technology. AOCS Press. Champaign, IL, pp. 235-268.

Okoshi K, Guimarães JFC, Di Muzio BP, Fernandes AAH, Okoshi MP. 2007. Diabetic cardiomyopathy. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 51(2):160 – 167.

Oliveira AC, Reis SM, Moraes CMB, Cunha JST, Haidamus LL, Feliciano LM, Simões MG. 2005. The use of soy oil deodorization distillate as an alternative source of vitamin E reduced the weight gain of rats. *Revista de Nutrição* 18(5):693–697.

Oliveira AC, Reis SM, Benites CI, Cavalheiro L, Souza MB, Faria M. 2006. Suplementación con el Destilado de la Desodorización de Aceite de Soja no causa toxicidad en ratas Wistar. 14º Congreso Latinoamericano de Nutrición, Florianópolis. *Anales*, 118.

Omar N, Bakar J, Muhammadd K. 2013. Determination of organochlorine pesticides in shrimp by gas Chromatography-mass spectrometry using a modified QuEChERS approach. *Food Control* 34:318-322.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2002. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, [Online]. Disponible en (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0220s/a0220s00.pdf>)

Pérez A, González G, Gonzalez, Heinzen H. 2010. Multiresidue determination of pesticides in lanolin using matrix solid –phase dispersion. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 93(2):712-719.

Pramparo PM, Prizzon S, Martinello MA. 2005. Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización. *Grasas Aceites* 56:228–234.

Ramírez JA y Lacasaña M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención y Riesgos Labor* 4: 67-75.

Red de Agricultura Sostenible. 2011. Lista de Plaguicidas Prohibidos. Red de Agricultura Sostenible, [Online]. Disponible en : [https://www.imaflora.org/downloads/biblioteca/RAS Lista de Plaguicidas Prohibidos Noviembre 2011.pdf](https://www.imaflora.org/downloads/biblioteca/RAS_Lista_de_Plaguicidas_Prohibidos_Noviembre_2011.pdf)

Redden, R. 2013. New approaches for crop genetic adaptation to the abiotic stresses predicted with climate change. *Agronomy* 3:419-432.

Ruiz AE, Wierna N, Bovi Mitre G. 2008. Plaguicidas organoclorados en leche cruda comercializada en Jujuy (Argentina). *Revista de Toxicología* 25:61-66.

Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, Babu MS. 2006. Effect of squalene on cyclophosphamide- induced toxicity. *Clinica Chimica Acta* 364:335–342.

Shaw GM, Nelson V, Iovannisci DM, Finnell RH, Lammer EJ. 2003. Maternal occupational chemical exposure and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies. *American Journal of Epidemiology* 157:475-484.

Singh RP, Vara PP, Raja R†. 2013. Impacts of Changing Climate and Climate Variability on Seed Production and Seed Industry. *Advances in Agronomy* 118: 49–110.

Smith KJ, Pollen PB, de Vries DM, Coon FB. 1968. Removal of chlorinated pesticides from crude vegetable oils by simulated commercial processing procedures. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45(12):866-869.

Smith TJ. 2000. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opin Invest Drugs* 9:1841–1848.

Smolarek AK, Suh N. 2012. Chemopreventive Activity of Vitamin E in Breast Cancer: A Focus on γ - and δ -Tocopherol. *Nutrients* 3: 962-986.

Teixeira ARS, Santos JLC, Crespo JG. 2011. Production of Steryl Esters from Vegetable Oil Deodorizer Distillates by Enzymatic Esterification. *Industrial & Engineering Chemistry* 50:2865–2875.

Traber MG. 2007. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition* 27:347–362.

Toledano RM, Cortes J, Rubio-Moraga A, Villen J, Vázquez A. 2012. Analysis of free and esterified sterols in edible oils by online reversed phase liquid chromatography-gas chromatography (RPLC-GC) using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface *Food Chemistry* 135:610–615.

Torres-González MO, Angulo-Guerrero RM, Oliart-Rosy LA. 2009. Efecto de la refinación física sobre la calidad química y sensorial del aceite de coco. *Grasas Aceites* 60(1):96-101.

Udaondo JC. 2012. Regulación de la biosíntesis de vitamina E y su función en la señalización celular en condiciones de estrés abiótico. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, [Online]. Disponible en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/83571/JCU_TESIS.pdf?sequence=1.

U. S. EPA. 2012. Types of pesticides. US. EPA, [Online]. Disponible en <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>

Valenzuela BA, Ronco MAM. 2004. Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista Chilena de Nutrición* 21(1):161-169.

Verleyen T, Verhe R, Garcia L, Dewettinck K, Huyghebaert A, De Greyt W. 2001. Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization Distillate. *Journal of Chromatography A* 921:277–285.

Verleyen T, Forcades M, Verhe R, Dewettinck K, Huyghebaert A, De Greyt W. 2002. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79:117-122.

Villa-Cornejo B. 2004. Manejo Integrado de Plagas. <http://www.union.org.mx/publicaciones/guia/actividadesyagravios/plagas.htm> revisado el 20 de junio de 2014.

- Vlahakis C, Hazebroek J. 2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77:49-53.
- Vogel JS, Keating GA, Buchholz BA. 2002. Protein binding of isofluorophate *in vivo* after coexposure to multiple chemicals. *Environmental Health Perspectives* 110(6):1031-1036.
- Wang T, Hicks BK, Moreau R. 2002. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79:1201–1206.
- Watanabe Y, Nagao T, Hirota Y, Kitano M, Shimada Y. 2004. Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step *in situ* enzymatic reaction. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81:339–345.
- Watkins C. 2005. The spread of phytosterols. *Inform* 16:344–345 22.
- Weill, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London* 269:2007-201.
- Wen-Hui L, Bin-Ding, Xiao-Ming R, Hai-Tao X, Jun Y, Shao-Min L. 2007. Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography–flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* 1163:304–311.
- Wiedermann LH. 1981. Degumming, refining and bleaching soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58(3):159-166.
- Willms JR, Salon C, Layzell DB 1999. Evidence for light-stimulated fatty acid synthesis in soybean fruit. *Plant Physiology* 120:1117-1127.
- Yan F, Yang H, Li J, Wang H. 2012. Optimization of phytosterols recovery from soybean oil deodorizer distillate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89:1363-1370
- Zhang Z, Yeung WK, Huang Y, Chen ZY. 2002. Effect of squalene and shark liver oil on serum cholesterol level in hamsters. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 53:411–418.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Jose Rodríguez Rodríguez

Candidato para el grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Alimentos

Tesis: “Evaluación de la factibilidad del aprovechamiento del subproducto de la desodorización de aceite de soya (*Glycine max* L.) como fuente de fitoesteroles, tocoferoles y escualeno”

Campo de Estudio: Alimentos

Datos Personales: Nacido en Rio Grande, Zacatecas, el 20 de enero de 1966.

Educación:

LICENCIATURA: Químico Bacteriólogo Parasitólogo, FCB, UANL, 1989.

MAESTRIA: Maestría en Ciencias Químicas con especialidad en Química Analítica. FCQ, UANL, 2008.

Experiencia Profesional:

Maestro por horas. FCB, UANL. 1989-1990
Químico Analista. GRUMA, S. A. de C. V. Departamento de aseguramiento de calidad.
1990- 1992. Sector alimentos.

Especialista en el área de cromatografía. ATLATEC. 1992-1996. Sector ambiental.

Supervisor del Área de cromatografía. ITESM. Laboratorio del Centro de Calidad Ambiental. 1992 – 2012.

Asesoría Científica de proyecto de tesis de estudiantes de licenciatura y posgrado del ITESM. 2008 - 2012.

ANEXO I

Resultados de muestras sintéticas para la validación de de Fitoesteroles y Escualeno.

Quantification Report (NOT Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\26\
Data File : 0900010.D
Acq On : 26 Jul 2012 14:36
Operator :
Sample : Val-01
Misc :
ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 01 18:03:03 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV1.M
Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
QLast Update : Tue Jul 31 10:08:31 2012
Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	317924	25.80	mg/L	88
2) Campesterol	14.53	43	27547	33.91	mg/L	91
3) Estigmaesterol	14.88	43	4254	5.90	mg/L	85
4) Beta-Sitoesterol	15.81	43	40441	36.74	mg/L	88

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV1.M Wed Aug 01 18:03:04 2012 CHEMSTATION

Quantification Report (NOT Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\26\
Data File : 1000011.D
Acq On : 26 Jul 2012 14:58
Operator :
Sample : Val-02
Misc :
ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 01 18:06:14 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV1.M
Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
QLast Update : Tue Jul 31 10:08:31 2012
Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.96	69	378744	30.74	mg/L	88
2) Campesterol	14.54	43	26635	32.00	mg/L	91
3) Estigmaesterol	14.88	43	4664	6.2	mg/L	89
4) Beta-Sitoesterol	15.81	43	40448	36.54	mg/L	87

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV1.M Wed Aug 01 18:06:15 2012 CHEMSTATION

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\26\
 Data File : 1100012.D
 Acq On : 26 Jul 2012 15:21
 Operator :
 Sample : Val-03
 Misc :
 ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 01 18:11:40 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV1.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Tue Jul 31 10:08:31 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)	

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	285240	23.15 mg/L		90
2) Campesterol	14.53	43	31809	37.05 mg/L		83
3) Estigmaesterol	14.88	43	4693	6.59 mg/L		91
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	44641	46.43 mg/L		97

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV1.M Wed Aug 01 18:11:41 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\26\
 Data File : 1200013.D
 Acq On : 26 Jul 2012 15:43
 Operator :
 Sample : Val-04
 Misc :
 ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 01 18:20:01 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV1.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Tue Jul 31 10:08:31 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)	

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.96	69	346117	28.09 mg/L		89
2) Campesterol	14.52	43	31903	37.69 mg/L		84
3) Estigmaesterol	14.88	43	4861	7.07 mg/L		90
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	44405	40.90 mg/L		95

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV1.M Wed Aug 01 18:20:02 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\26\
 Data File : 1300014.D
 Acq On : 26 Jul 2012 16:06
 Operator :
 Sample : Val-05
 Misc :
 ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 01 18:28:39 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV1.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Tue Jul 31 10:08:31 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)	

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.96	69	225939	18.34 mg/L		90
2) Campesterol	14.54	43	27046	31.73 mg/L		88
3) Estigmaesterol	14.89	43	4697	6.98 mg/L		85
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	44357	40.28 mg/L		86

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV1.M Wed Aug 01 18:28:40 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\27a\
 Data File : 0900010.D
 Acq On : 27 Jul 2012 12:16
 Operator :
 Sample : Val-06
 Misc :
 ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:00:48 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV2.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Mon Jul 30 17:14:25 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)	

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	264929	24.19 mg/L		90
2) Campesterol	14.53	43	27208	32.47 mg/L		81
3) Estigmaesterol	14.87	43	4729	7.24 mg/L		91
4) Beta-Sitoesterol	15.81	43	48779	44.84 mg/L		88

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV2.M Thu Aug 02 09:00:49 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\27a\
 Data File : 1000011.D
 Acq On : 27 Jul 2012 12:38
 Operator :
 Sample : Val-07
 Misc :
 ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:04:49 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV2.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Mon Jul 30 17:14:25 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)	

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	261099	23.50 mg/L		90
2) Campesterol	14.52	43	28643	34.18 mg/L		87
3) Estigmaesterol	14.87	43	4699	7.09 mg/L		91
4) Beta-Sitoesterol	15.81	43	48226	44.33 mg/L		87

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV2.M Thu Aug 02 09:04:49 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\27a\
 Data File : 1100012.D
 Acq On : 27 Jul 2012 13:01
 Operator :
 Sample : Val-08
 Misc :
 ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:12:33 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV2.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Mon Jul 30 17:14:25 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)	

Target Compounds						Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	261524	23.90 mg/L		89
2) Campesterol	14.53	43	26498	31.62 mg/L		89
3) Estigmaesterol	14.88	43	4622	6.92 mg/L		93
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	48837	44.89 mg/L		90

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV2.M Thu Aug 02 09:12:33 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\27a\
 Data File : 1200013.D
 Acq On : 27 Jul 2012 13:23
 Operator :
 Sample : Val-09
 Misc :
 ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:16:19 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV2.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Mon Jul 30 17:14:25 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

Target Compounds							Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	264218	24.16	mg/L		91
2) Campesterol	14.53	43	28898	34.49	mg/L		83
3) Estigmaesterol	14.88	43	4776	7.36	mg/L		91
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	50495	46.41	mg/L		90

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV2.M Thu Aug 02 09:16:20 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\27a\
 Data File : 1300014.D
 Acq On : 27 Jul 2012 13:46
 Operator :
 Sample : Val-10
 Misc :
 ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:27:15 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV2.M
 Quant Title : Calibracion de Fitoesteroles Validacion No. 1
 QLast Update : Mon Jul 30 17:14:25 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

Target Compounds							Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	263967	23.98	mg/L		90
2) Campesterol	14.53	43	26864	32.06	mg/L		78
3) Estigmaesterol	14.87	43	4794	7.94	mg/L		91
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	50246	46.19	mg/L		86

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV2.M Thu Aug 02 09:27:16 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\30a\
 Data File : 0900010.D
 Acq On : 30 Jul 2012 16:47
 Operator :
 Sample : Val-11
 Misc :
 ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:32:12 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV3.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Jul 31 09:47:58 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

Target Compounds							Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	260249	24.70	mg/L		98
2) Campesterol	14.51	43	26968	32.42	mg/L		90
3) Estigmaesterol	14.89	55	5056	7.70	mg/L		86
4) Beta-Sitoesterol	15.81	43	41587	37.94	mg/L		97

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV3.M Thu Aug 02 09:32:13 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\30a\
 Data File : 1000011.D
 Acq On : 30 Jul 2012 17:10
 Operator :
 Sample : Val-12
 Misc :
 ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:40:24 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV3.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Jul 31 09:47:58 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

Target Compounds							Qvalue
1) Escualeno	9.96	69	251823	23.41	mg/L		98
2) Campesterol	14.52	43	25875	30.25	mg/L		86
3) Estigmaesterol	14.90	55	4530	7.06	mg/L		90
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	41890	36.95	mg/L		94

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV3.M Thu Aug 02 09:40:25 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\30a\
 Data File : 1100012.D
 Acq On : 30 Jul 2012 17:32
 Operator :
 Sample : Val-13
 Misc :
 ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:47:43 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV3.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Jul 31 09:47:58 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

Target Compounds							Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	248877	23.62	mg/L		99
2) Campesterol	14.54	43	20687	24.19	mg/L		85
3) Estigmaesterol	14.89	55	4285	6.70	mg/L		88
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	38748	35.35	mg/L		89

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV3.M Thu Aug 02 09:47:43 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\30a\
 Data File : 1200013.D
 Acq On : 30 Jul 2012 17:55
 Operator :
 Sample : Val-14
 Misc :
 ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:44:54 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV3.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Jul 31 09:47:58 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

Target Compounds							Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	256175	24.11	mg/L		97
2) Campesterol	14.52	43	23809	27.84	mg/L		87
3) Estigmaesterol	14.88	55	5059	7.68	mg/L		93
4) Beta-Sitoesterol	15.81	43	42650	38.91	mg/L		98

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV3.M Thu Aug 02 09:44:55 2012 CHEMSTATION

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\JUL\30a\
Data File : 1300014.D
Acq On : 30 Jul 2012 18:17
Operator :
Sample : Val-15
Misc :
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 02 09:49:30 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOV3.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Jul 31 09:47:58 2012
Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)

Target Compounds					Qvalue
1) Escualeno	9.95	69	234930	22.34 mg/L	100
2) Campesterol	14.54	43	19697	23.03 mg/L	86
3) Estigmaesterol	14.88	55	3076	4.45 mg/L	99
4) Beta-Sitoesterol	15.82	43	39981	36.47 mg/L	96

(m) = manual integration (+) = signals summed

FITOV3.M Thu Aug 02 09:49:31 2012 CHEMSTATION

ANEXO II.

Reportes de análisis de Fitoesteroles esterificados y libres.

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 1400017.D
Acq On : 22 Aug 2012 21:23
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : Premium No.1Extracto A Esterificados
ALS Vial : 14 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:06:19 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc Units	Dev(Min)

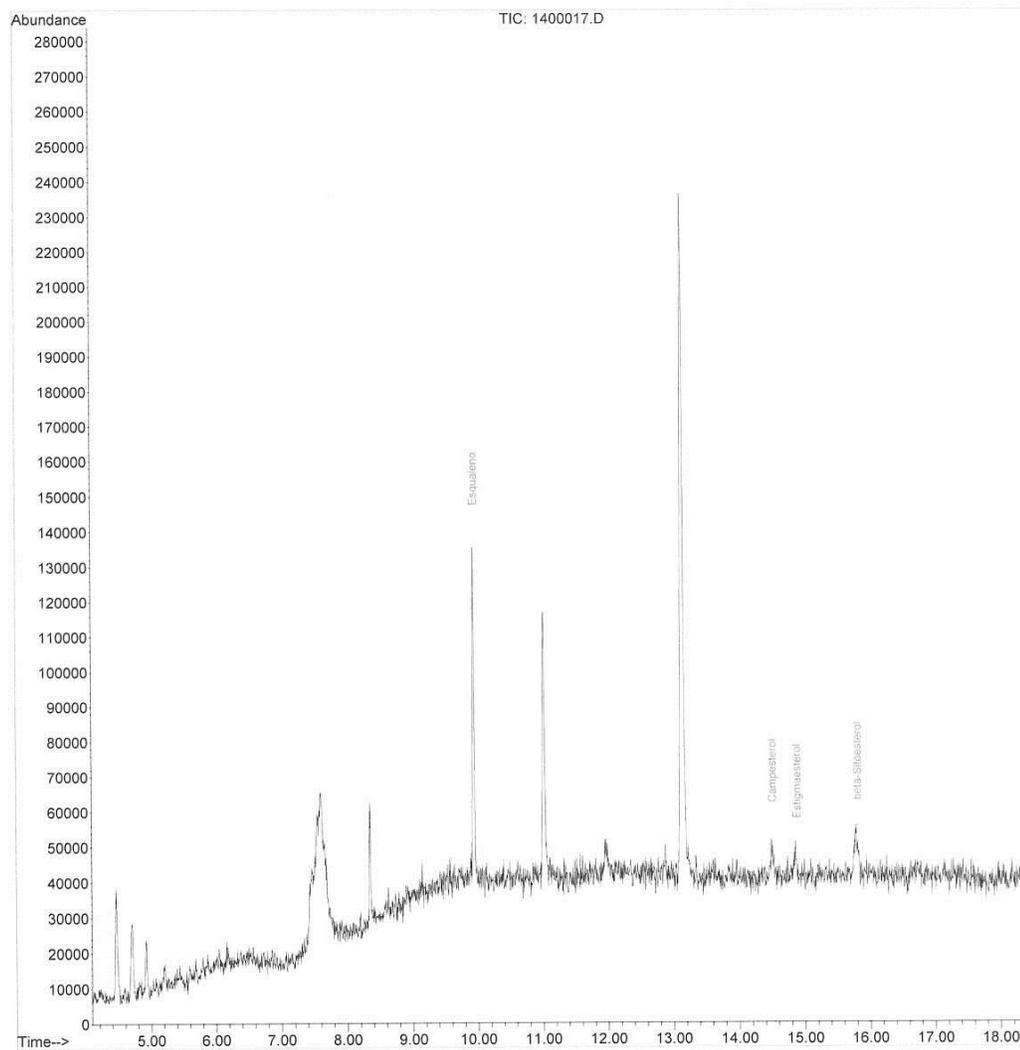
Target Compounds					Qvalue
1) Esqualeno	9.94	69	37384	5.63 mg/L	97
2) Campesterol	14.51	43	1989	8.03 mg/L #	81
3) Estigmaesterol	14.88	43	396	3.92 mg/L #	24
4) beta-Sitoesterol	15.81	43	302	6.05 mg/L #	26

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 1400017.D
Acq On : 22 Aug 2012 21:23
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : Premium No.1Extracto A Esterificados
ALS Vial : 14 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:06:19 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 1500018.D
 Acq On : 22 Aug 2012 21:44
 Operator :
 Sample : Mta-02
 Misc : Premium No.1Extracto B Libres
 ALS Vial : 15 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:06:03 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
 Response via : Initial Calibration

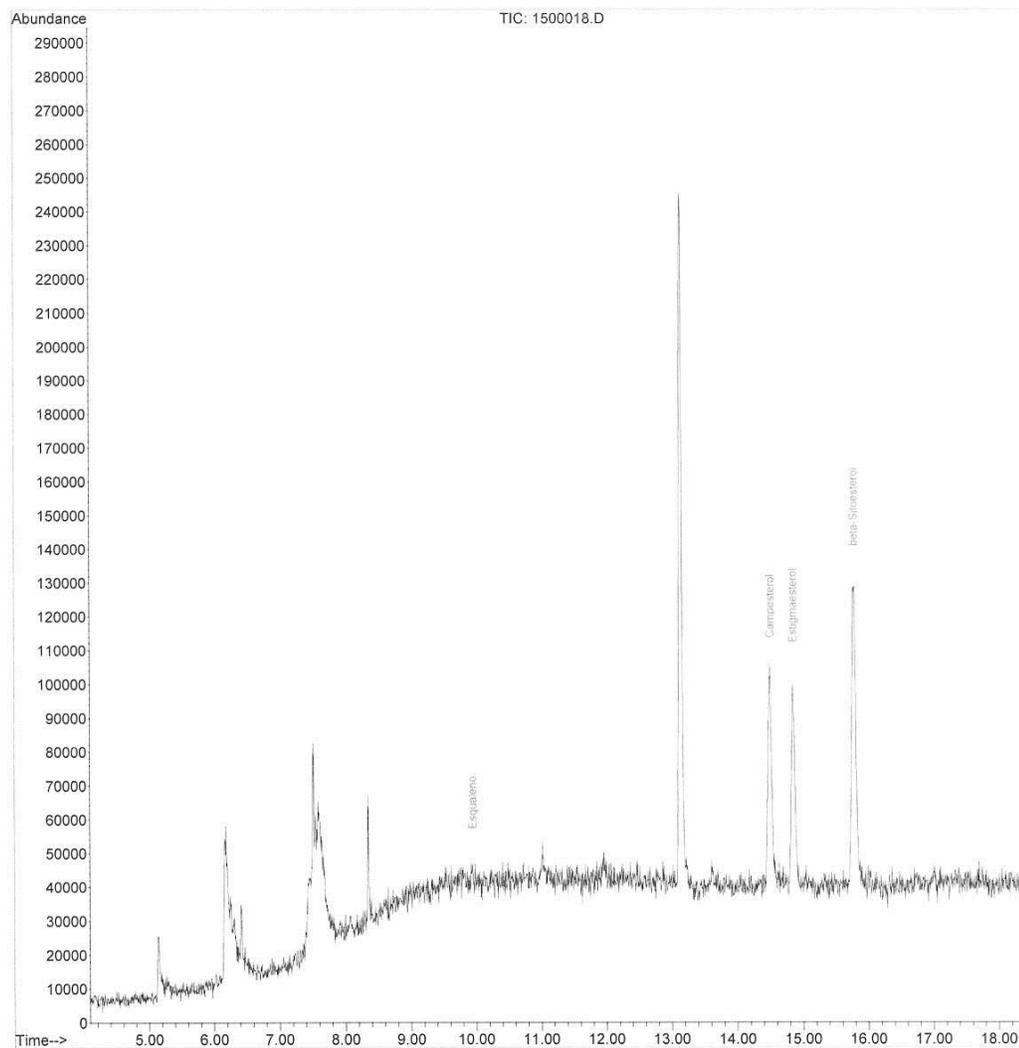
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
						Qvalue
Target Compounds						
1) Esqualeno	9.93	69	1552	2.55 mg/L	#	78
2) Campesterol	14.51	43	11704	18.14 mg/L	#	39
3) Estigmaesterol	14.85	43	4756	10.56 mg/L	#	65
4) beta-Sitoesterol	15.78	43	14890	16.18 mg/L	#	76

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 1500018.D
Acq On : 22 Aug 2012 21:44
Operator :
Sample : Mta-02
Misc : Premium No.1Extracto B Libres
ALS Vial : 15 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:06:03 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 1600019.D
 Acq On : 22 Aug 2012 22:06
 Operator :
 Sample : Mta-03
 Misc : Premium No.2Extracto A Esterificados
 ALS Vial : 16 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 13:20:57 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Thu Aug 23 13:19:32 2012
 Response via : Initial Calibration

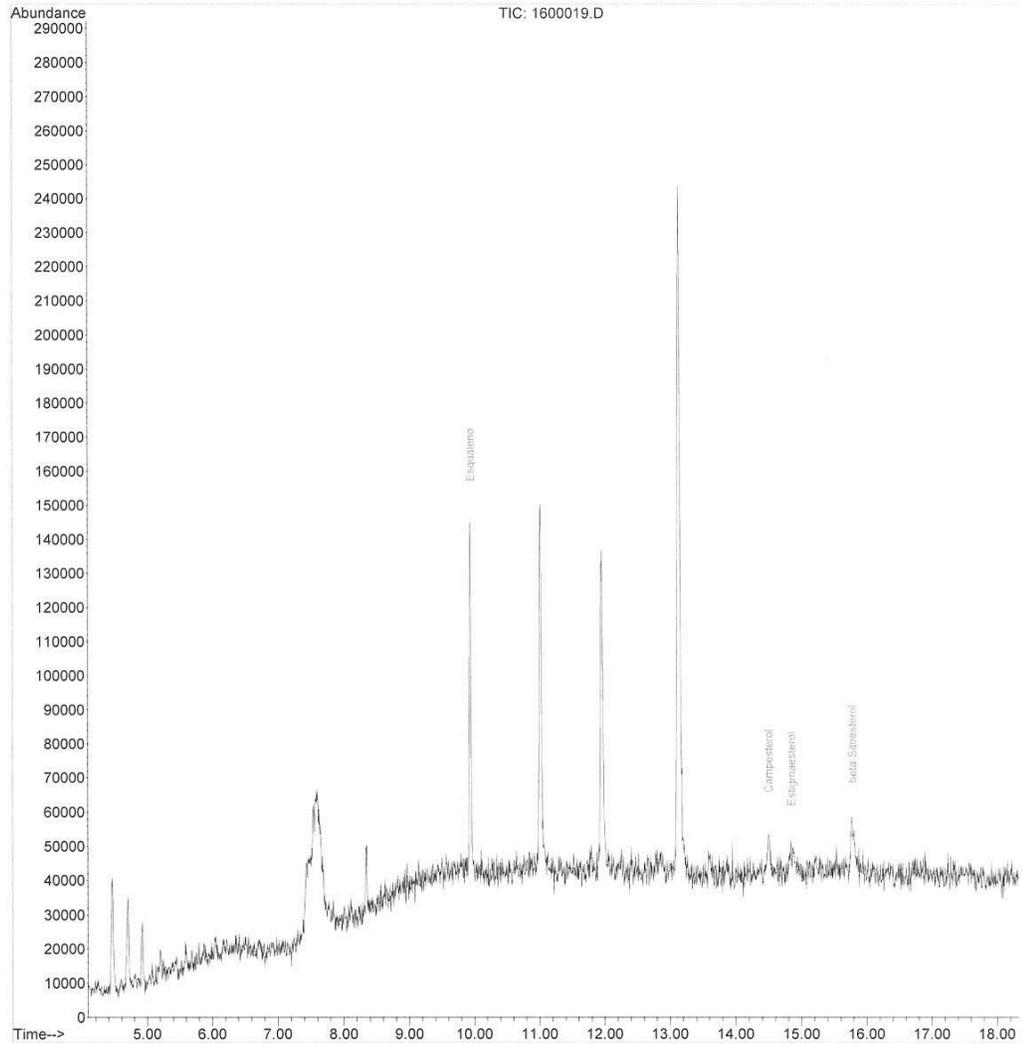
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
						Qvalue
1) Esqualeno	9.94	69	41558	5.20	mg/L #	95
2) Campesterol	14.51	43	1234	7.24	mg/L #	62
3) Estigmaesterol	14.86	43	407	4.10	mg/L #	70
4) beta-Sitoesterol	15.79	43	612	6.81	mg/L #	1

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 1600019.D
Acq On : 22 Aug 2012 22:06
Operator :
Sample : Mta-03
Misc : Premium No.2Extracto A Esterificados
ALS Vial : 16 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 13:20:57 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Thu Aug 23 13:19:32 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 1700020.D
 Acq On : 22 Aug 2012 22:27
 Operator :
 Sample : Mta-04
 Misc : Premium No.2Extracto B Libres
 ALS Vial : 17 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:06:45 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
 Response via : Initial Calibration

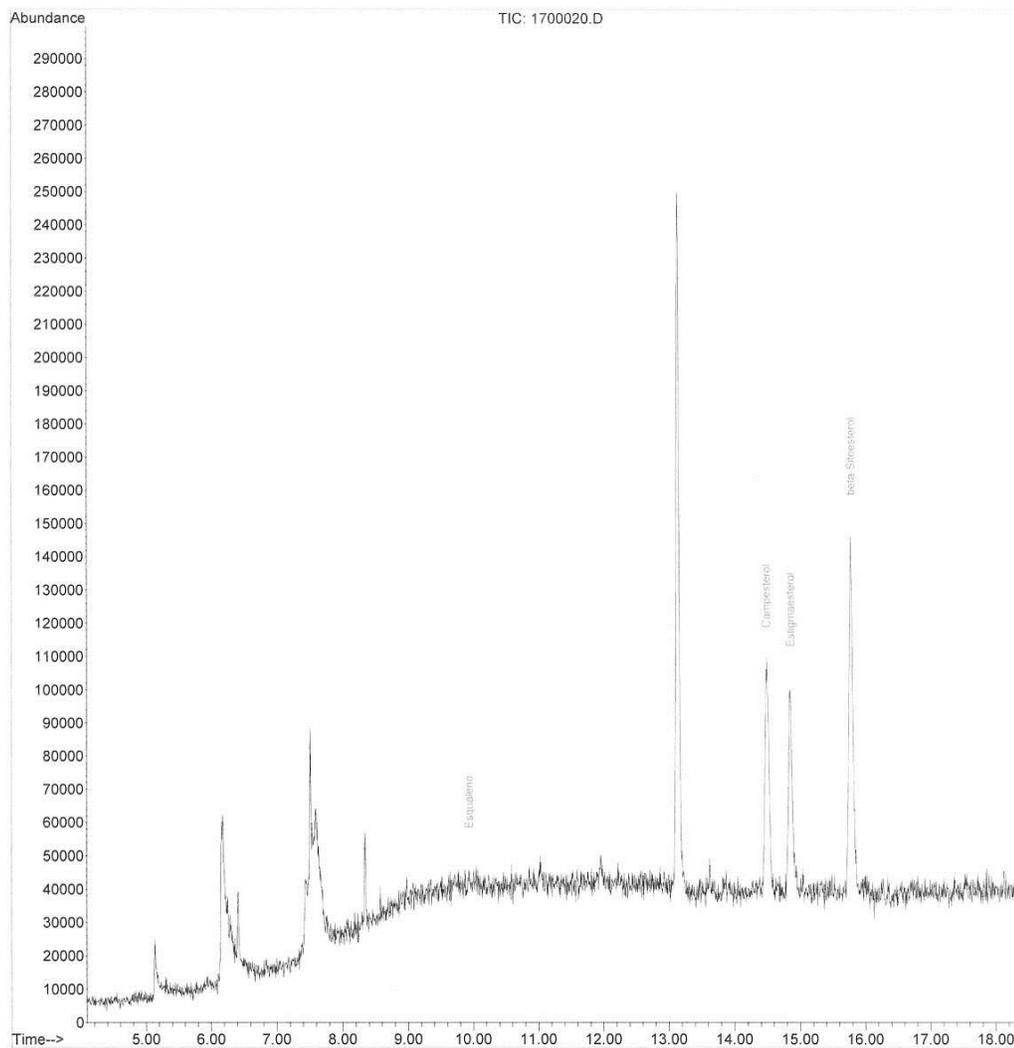
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	Qvalue
Target Compounds							
1) Esqualeno	9.94	69	2041	2.60	mg/L #		94
2) Campesterol	14.49	43	730	6.72	mg/L #		1
3) Estigmaesterol	14.85	43	3319	8.37	mg/L #		47
4) beta-Sitoesterol	15.78	43	14881	16.17	mg/L #		46

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 1700020.D
Acq On : 22 Aug 2012 22:27
Operator :
Sample : Mta-04
Misc : Premium No.2Extracto B Libres
ALS Vial : 17 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:06:45 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 1800022.D
 Acq On : 22 Aug 2012 23:10
 Operator :
 Sample : Mta-05
 Misc : Premium No.3Extracto A Esterificados
 ALS Vial : 18 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 13:21:32 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Thu Aug 23 13:19:32 2012
 Response via : Initial Calibration

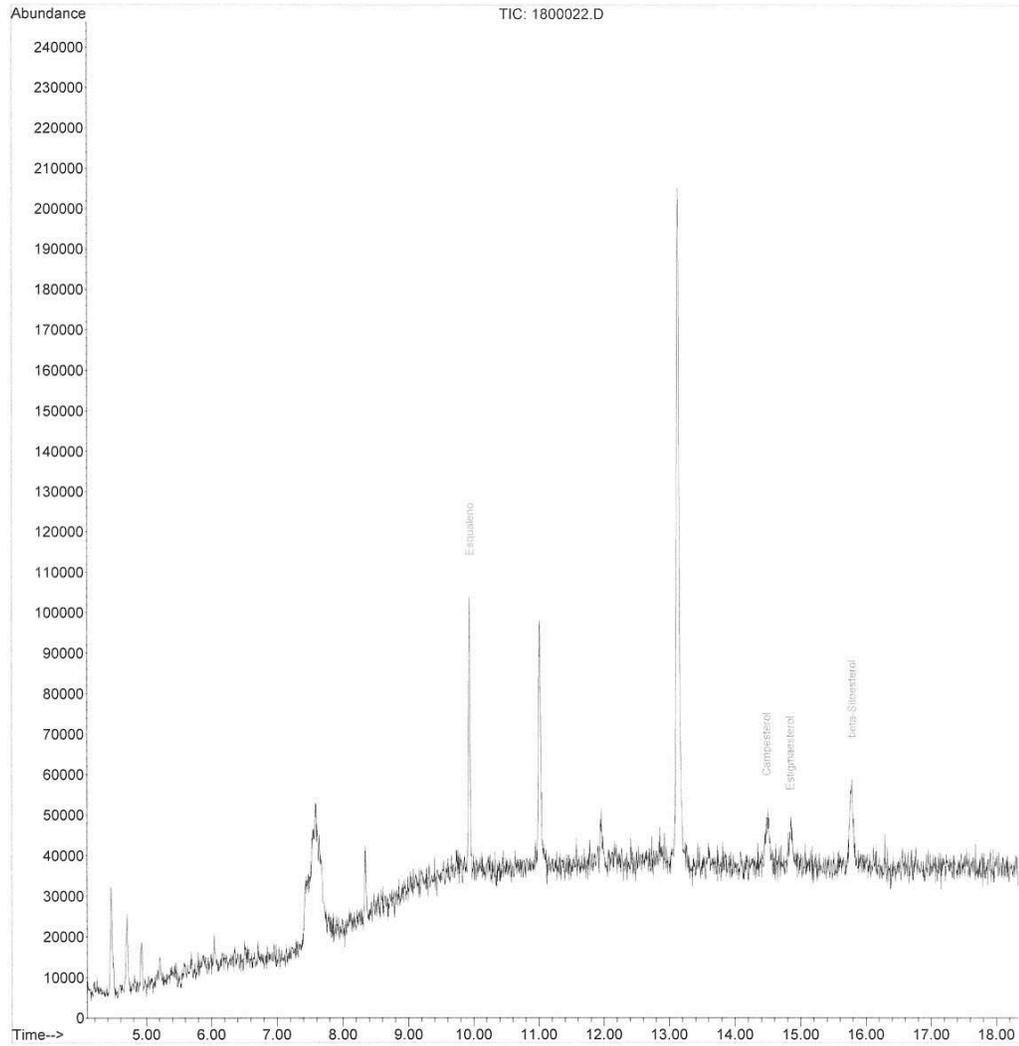
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
						Qvalue
Target Compounds						
1) Esqualeno	9.94	69	26985	4.13 mg/L	#	89
2) Campesterol	14.49	43	1326	7.34 mg/L	#	80
3) Estigmaesterol	14.84	43	992	5.03 mg/L	#	25
4) beta-Sitoesterol	15.78	43	614	6.82 mg/L	#	3

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 1800022.D
Acq On : 22 Aug 2012 23:10
Operator :
Sample : Mta-05
Misc : Premium No.3Extracto A Esterificados
ALS Vial : 18 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 13:21:32 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Thu Aug 23 13:19:32 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 1900023.D
 Acq On : 22 Aug 2012 23:32
 Operator :
 Sample : Mta-06
 Misc : Premium No.3Extracto B Libres
 ALS Vial : 19 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 13:21:46 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Thu Aug 23 13:19:32 2012
 Response via : Initial Calibration

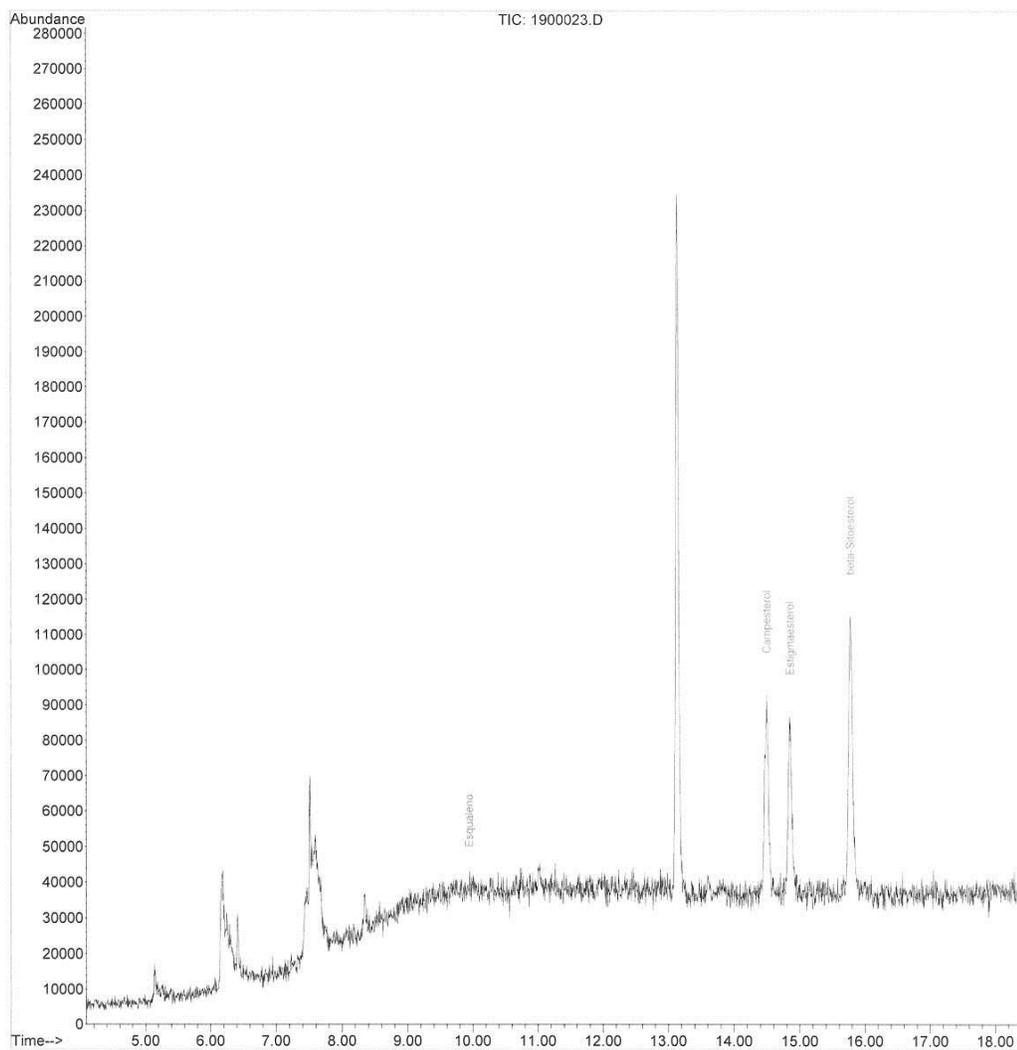
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
						Qvalue
1) Esqualeno	9.94	69	1625	2.25	mg/L #	84
2) Campesterol	14.50	43	10675	17.07	mg/L #	62
3) Estigmaesterol	14.86	43	1530	5.88	mg/L #	10
4) beta-Sitoesterol	15.78	43	8137	12.49	mg/L #	72

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 1900023.D
Acq On : 22 Aug 2012 23:32
Operator :
Sample : Mta-06
Misc : Premium No.3Extracto B Libres
ALS Vial : 19 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 13:21:46 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Thu Aug 23 13:19:32 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 2000024.D
 Acq On : 22 Aug 2012 23:53
 Operator :
 Sample : Mta-07
 Misc : Premium No.4Extracto A Esterificados
 ALS Vial : 20 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 12:51:10 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Thu Aug 23 12:34:24 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

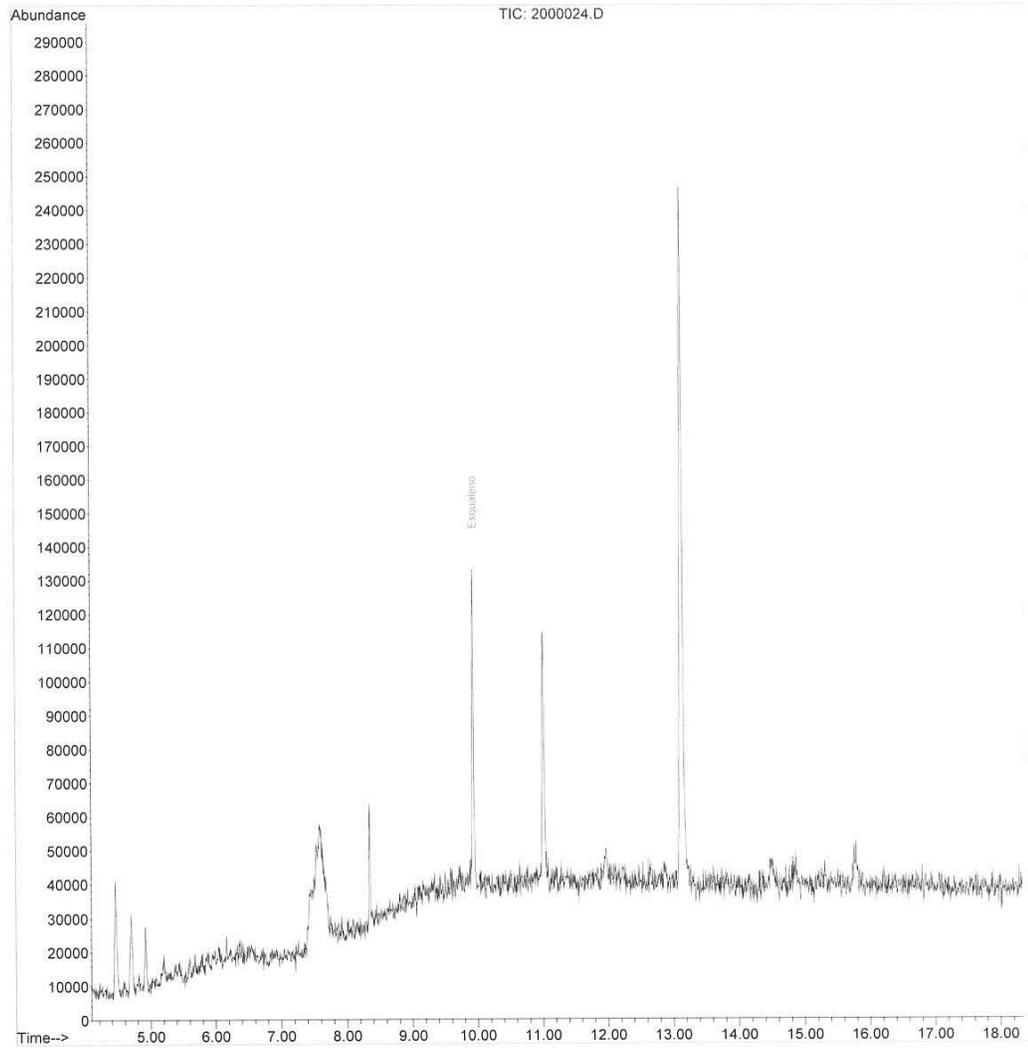
Target Compounds						Qvalue
1) Esqualeno	9.94	69	393868	4.05	mg/L	# 97
2) Campesterol	0.00	43	0		N.D.	
3) Estigmaesterol	0.00	43	0		N.D.	
4) beta-Sitoesterol	0.00	43	0		N.D.	

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 2000024.D
Acq On : 22 Aug 2012 23:53
Operator :
Sample : Mta-07
Misc : Premium No.4Extracto A Esterificados
ALS Vial : 20 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Aug 23 12:51:10 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Thu Aug 23 12:34:24 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 2100025.D
 Acq On : 23 Aug 2012 00:15
 Operator :
 Sample : Mta-08
 Misc : Premium No.4Extracto B Libres
 ALS Vial : 21 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:29:00 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
 Response via : Initial Calibration

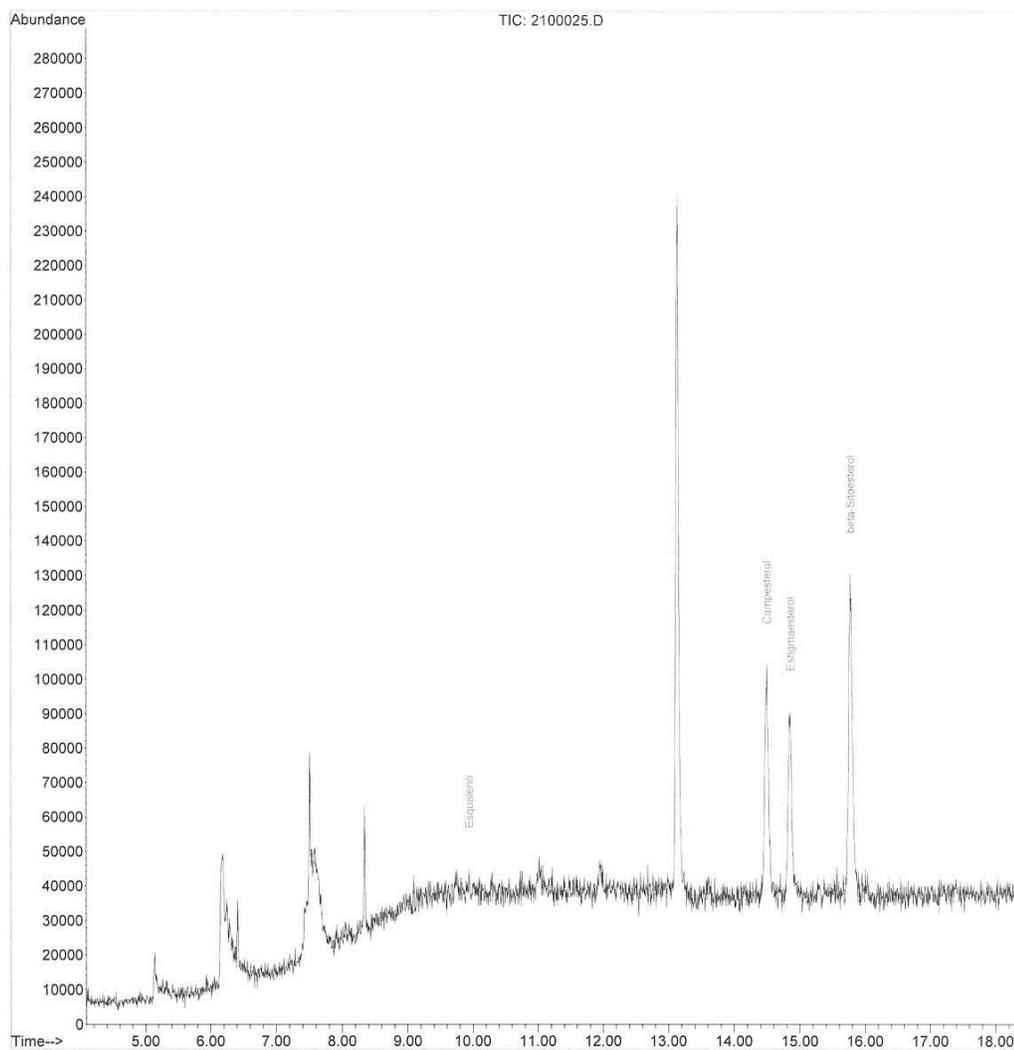
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
						Qvalue
1) Esqualeno	9.94	69	1198	2.52 mg/L	#	73
2) Campesterol	14.51	43	13715	20.24 mg/L	#	45
3) Estigmaesterol	14.86	43	1277	5.26 mg/L	#	1
4) beta-Sitoesterol	15.78	43	15462	16.57 mg/L	#	83

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 2100025.D
Acq On : 23 Aug 2012 00:15
Operator :
Sample : Mta-08
Misc : Premium No.4Extracto B Libres
ALS Vial : 21 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:29:00 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (NOT Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 2200026.D
 Acq On : 23 Aug 2012 00:36
 Operator :
 Sample : Mta-09
 Misc : Premium No.5Extracto A Esterificados
 ALS Vial : 22 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:31:08 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

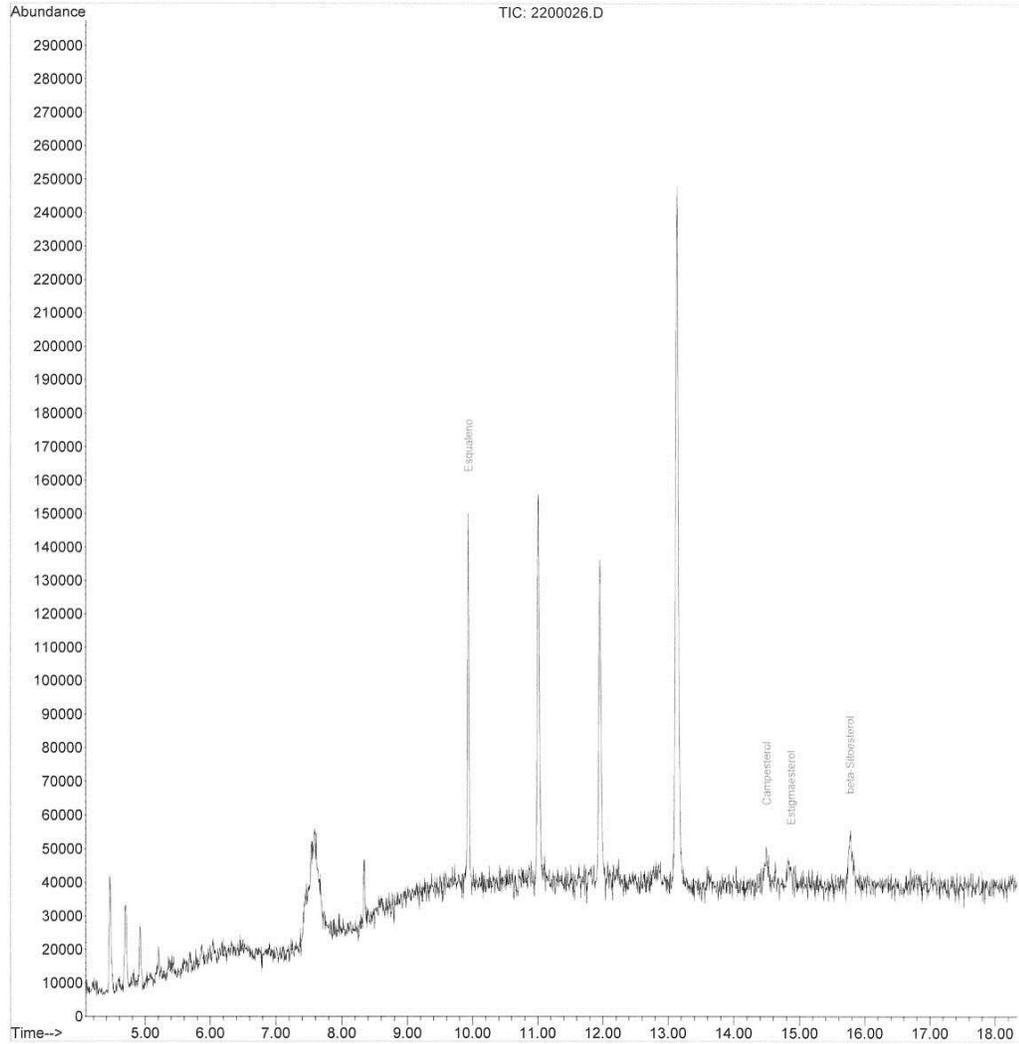
Target Compounds						Qvalue
1) Esqualeno	9.94	69	41136	5.95	mg/L #	95
2) Campesterol	14.51	43	526	6.51	mg/L #	1
3) Estigmaesterol	14.88	43	1362	5.39	mg/L #	20
4) beta-Sitoesterol	15.77	43	1489	6.88	mg/L #	51

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 2200026.D
Acq On : 23 Aug 2012 00:36
Operator :
Sample : Mta-09
Misc : Premium No.5Extracto A Esterificados
ALS Vial : 22 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:31:08 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
 Data File : 2300028.D
 Acq On : 23 Aug 2012 1:19
 Operator :
 Sample : Mta-10
 Misc : Premium No.5Extracto B Libres
 ALS Vial : 23 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:07:17 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
 Quant Title :
 QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

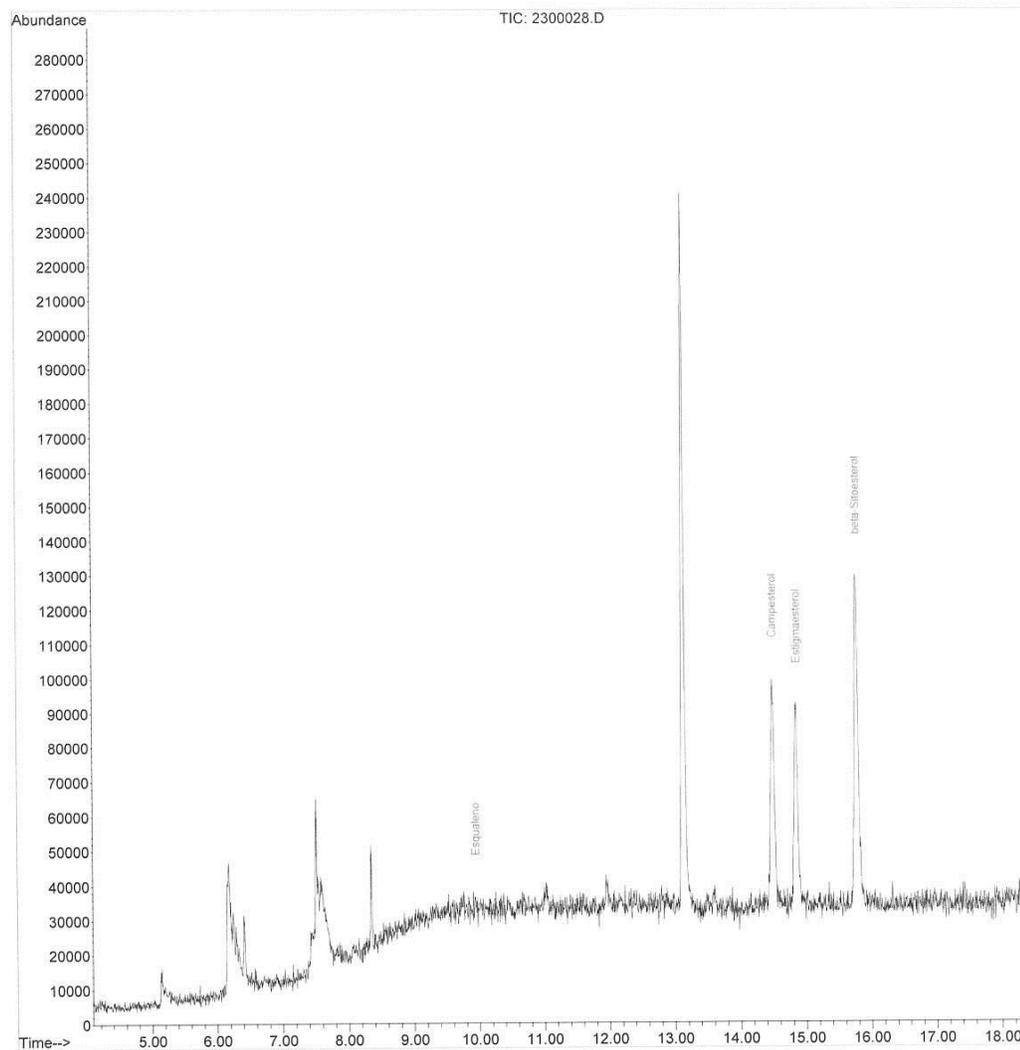
Target Compounds							Qvalue
1) Esqualeno	9.94	69	1619	2.56	mg/L	#	85
2) Campesterol	14.49	43	7997	14.28	mg/L	#	52
3) Estigmaesterol	14.86	43	1083	4.97	mg/L	#	6
4) beta-Sitoesterol	15.78	43	10864	13.38	mg/L	#	65

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Ago\22\
Data File : 2300028.D
Acq On : 23 Aug 2012 1:19
Operator :
Sample : Mta-10
Misc : Premium No.5Extracto B Libres
ALS Vial : 23 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Sep 18 16:07:17 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FITOMC1.M
Quant Title :
QLast Update : Fri Aug 24 12:06:40 2012
Response via : Initial Calibration



ANEXO III.

Resultados de muestras sintéticas para la validación de tocoferoles.

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
Data File : 0900010.D
Acq On : 12 Oct 2012 13:09
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : Muestra Val-01 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:56:44 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

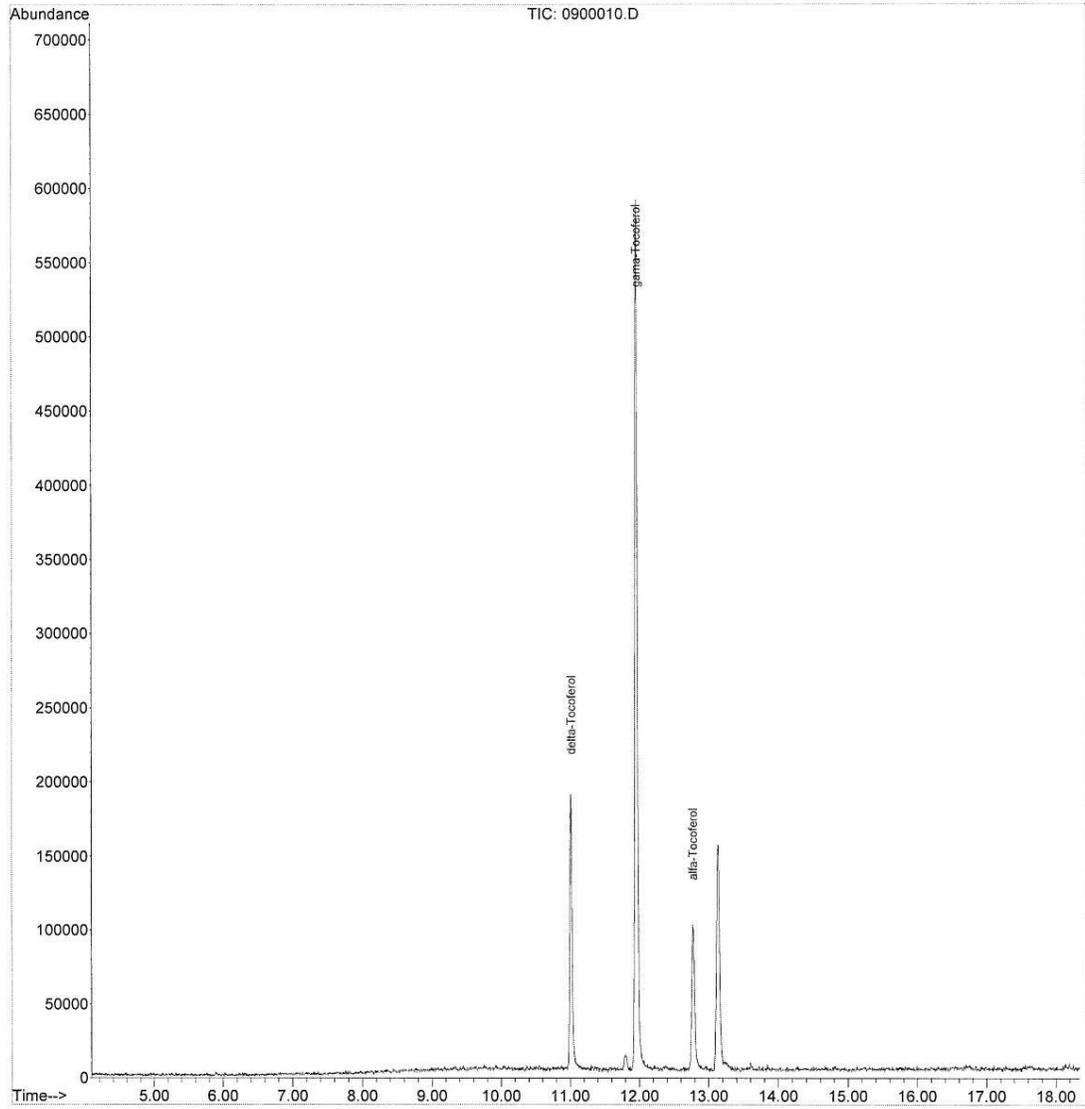
Target Compounds						Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.77	430	29115	10.21	mg/L #	83
2) gama-Tocoferol	11.96	416	156770	54.13	mg/L #	3
3) delta-Tocoferol	11.02	402	48804	21.00	mg/L	94

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
Data File : 0900010.D
Acq On : 12 Oct 2012 13:09
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : Muestra Val-01 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:56:44 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
 Data File : 1000011.D
 Acq On : 12 Oct 2012 13:31
 Operator :
 Sample : Mta-02
 Misc : Muestra Val-02 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:57:23 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

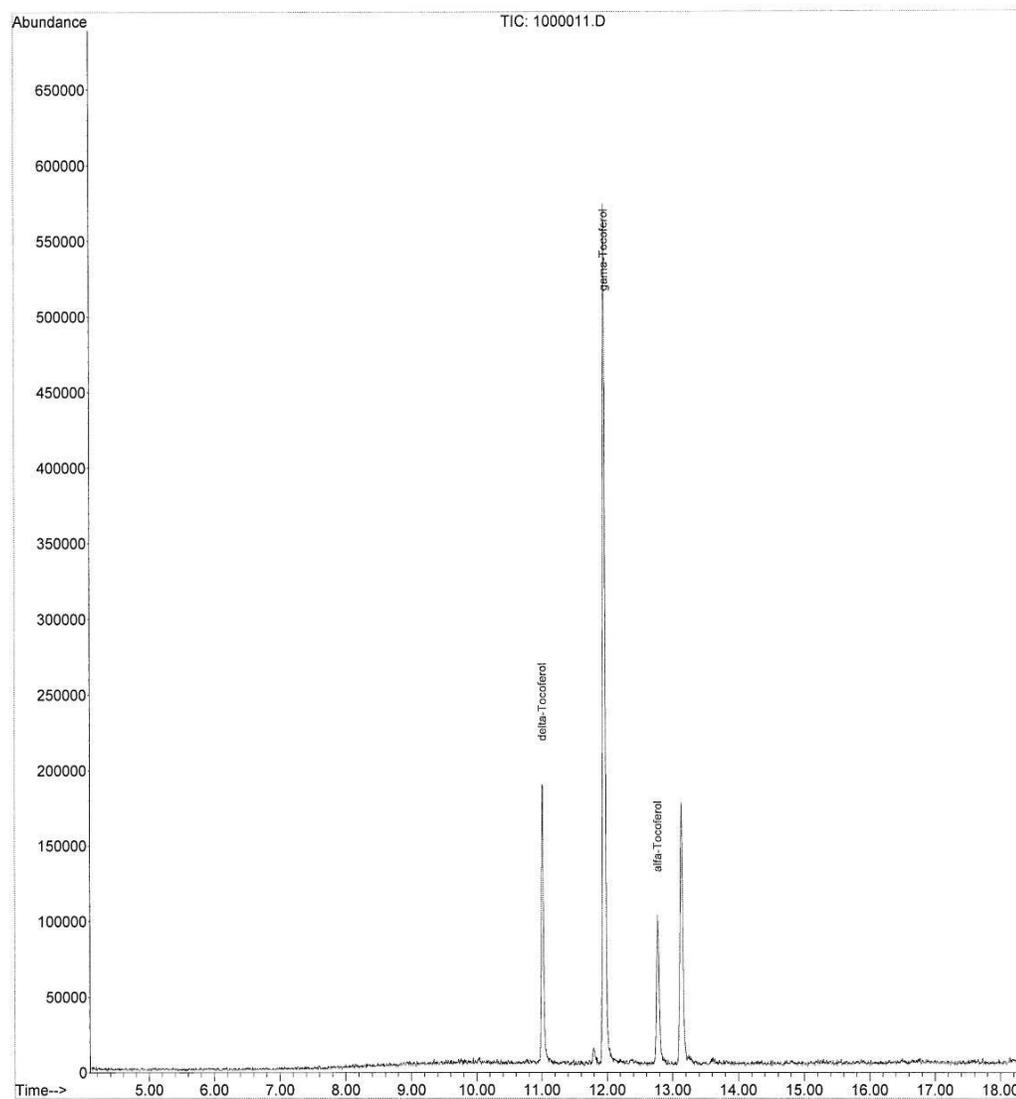
Target Compounds						Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.77	430	28987	10.17	mg/L #	79
2) gama-Tocoferol	11.96	416	158309	54.65	mg/L	93
3) delta-Tocoferol	11.01	402	48291	20.80	mg/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
Data File : 1000011.D
Acq On : 12 Oct 2012 13:31
Operator :
Sample : Mta-02
Misc : Muestra Val-02 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:57:23 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
 Data File : 1100012.D
 Acq On : 12 Oct 2012 13:54
 Operator :
 Sample : Mta-03
 Misc : Muestra Val-03 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:57:54 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
 Response via : Initial Calibration

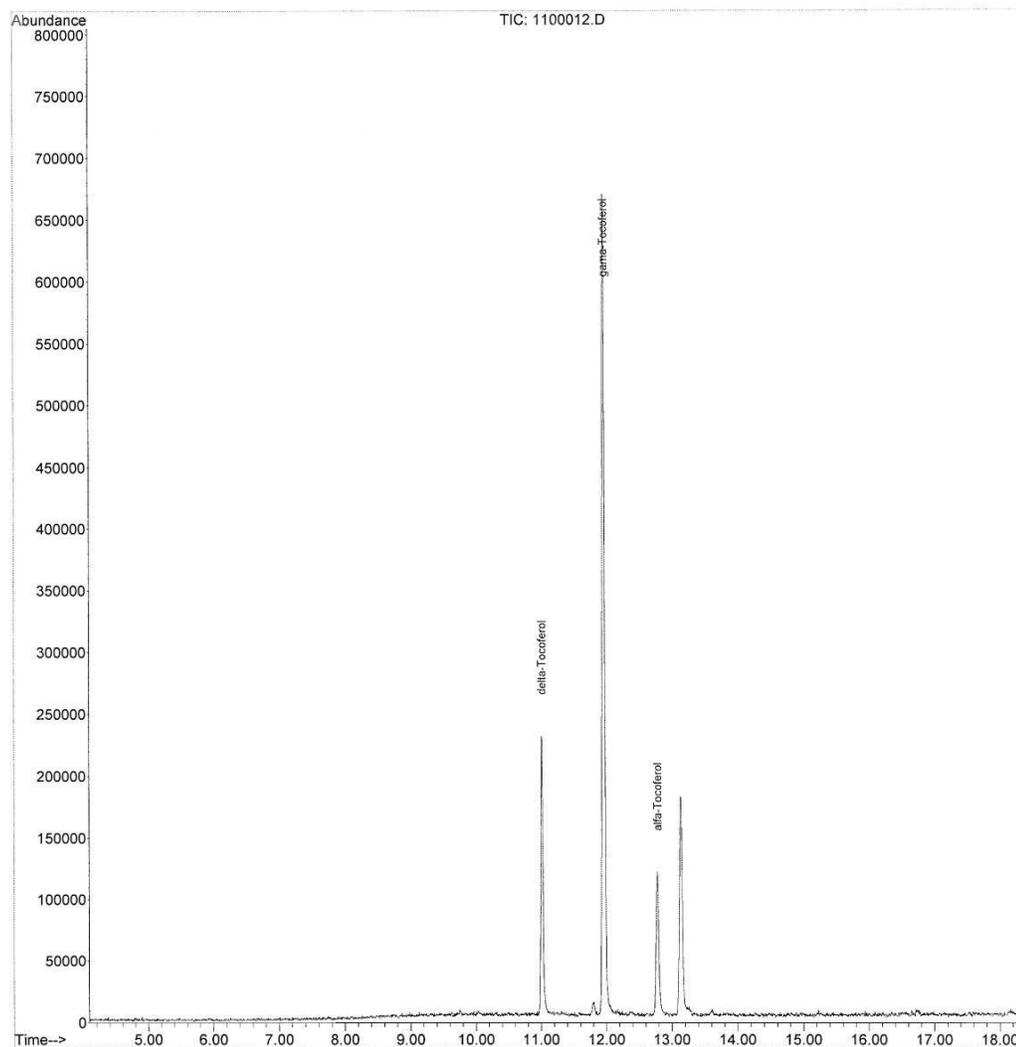
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
						Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.78	430	34648	11.87	mg/L	90
2) gama-Tocoferol	11.96	416	178302	61.44	mg/L #	3
3) delta-Tocoferol	11.01	402	58970	24.96	mg/L	94

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
Data File : 1100012.D
Acq On : 12 Oct 2012 13:54
Operator :
Sample : Mta-03
Misc : Muestra Val-03 Mix Tocopheroles
ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:57:54 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
 Data File : 1200013.D
 Acq On : 12 Oct 2012 14:17
 Operator :
 Sample : Mta-04
 Misc : Muestra Val-04 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:58:20 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

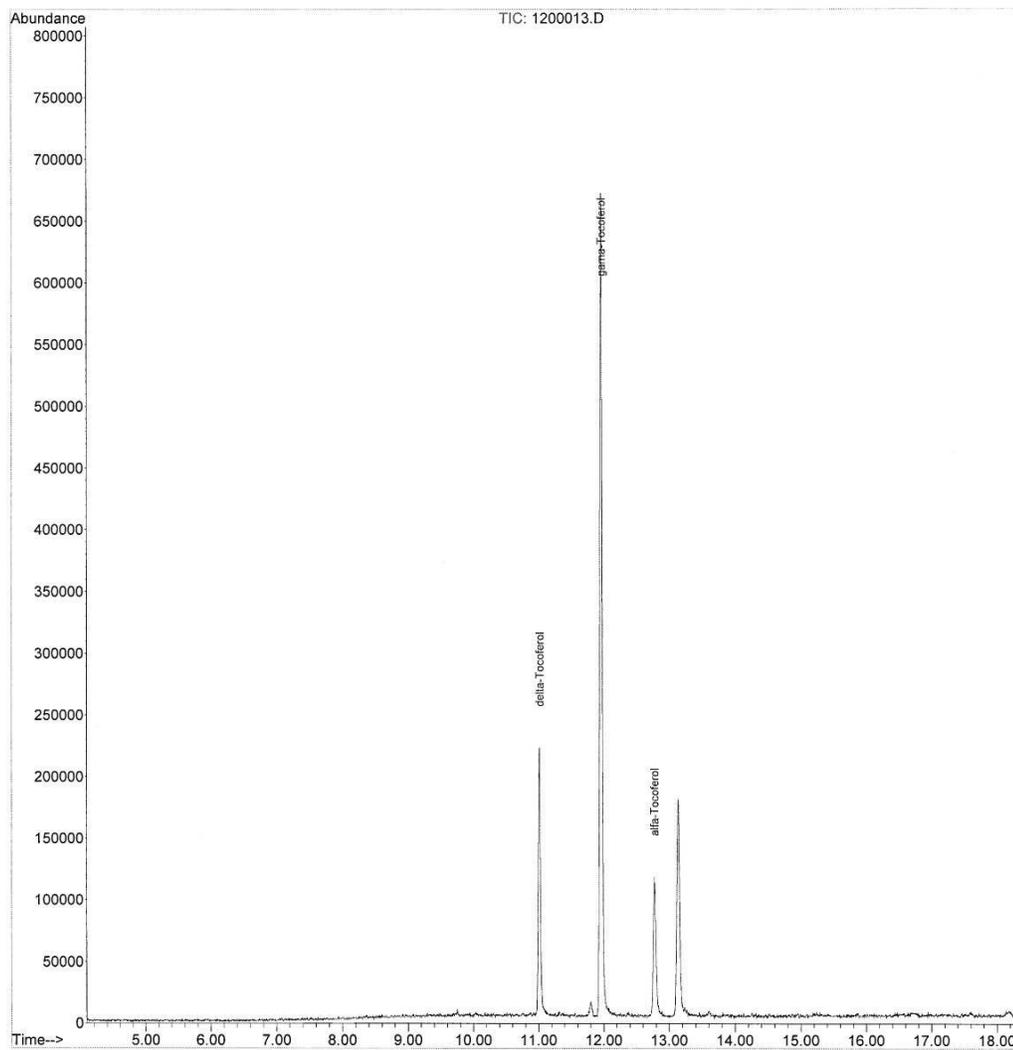
Target Compounds							Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.77	430	35208	12.04	mg/L	#	77
2) gama-Tocoferol	11.96	416	168621	58.15	mg/L	#	3
3) delta-Tocoferol	11.01	402	56028	23.82	mg/L		94

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
Data File : 1200013.D
Acq On : 12 Oct 2012 14:17
Operator :
Sample : Mta-04
Misc : Muestra Val-04 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:58:20 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
 Data File : 1300014.D
 Acq On : 12 Oct 2012 14:39
 Operator :
 Sample : Mta-05
 Misc : Muestra Val-05 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:58:48 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

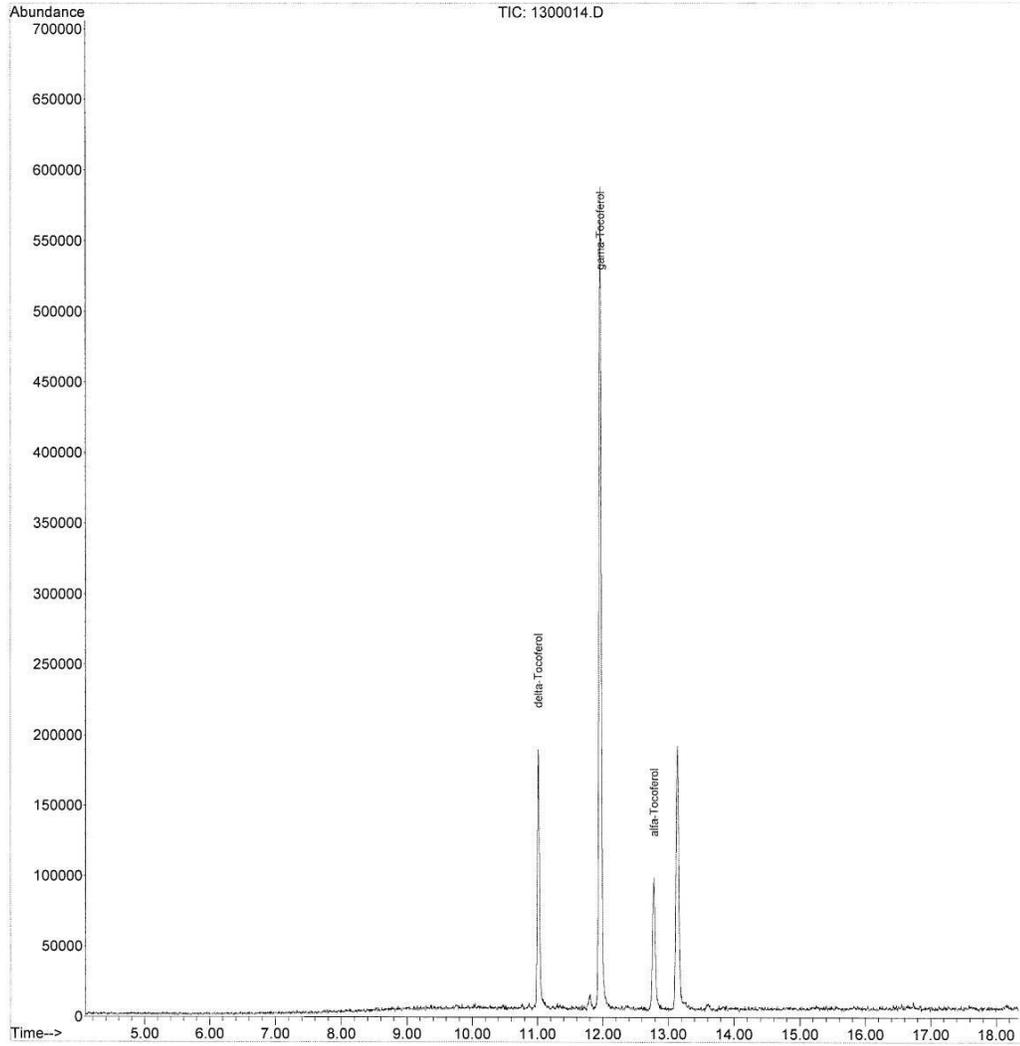
Target Compounds						Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.78	430	28082	9.90	mg/L	# 82
2) gama-Tocoferol	11.96	416	152097	52.55	mg/L	98
3) delta-Tocoferol	11.01	402	49569	21.30	mg/L	93

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\12\
Data File : 1300014.D
Acq On : 12 Oct 2012 14:39
Operator :
Sample : Mta-05
Misc : Muestra Val-05 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 22:58:48 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121012.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 21:55:42 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
 Data File : 0900010.D
 Acq On : 13 Oct 2012 13:25
 Operator :
 Sample : Mta-01
 Misc : Muestra Val-06 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:01:39 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
 Quant Title :
 QLast Update : Mon Oct 29 19:36:54 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

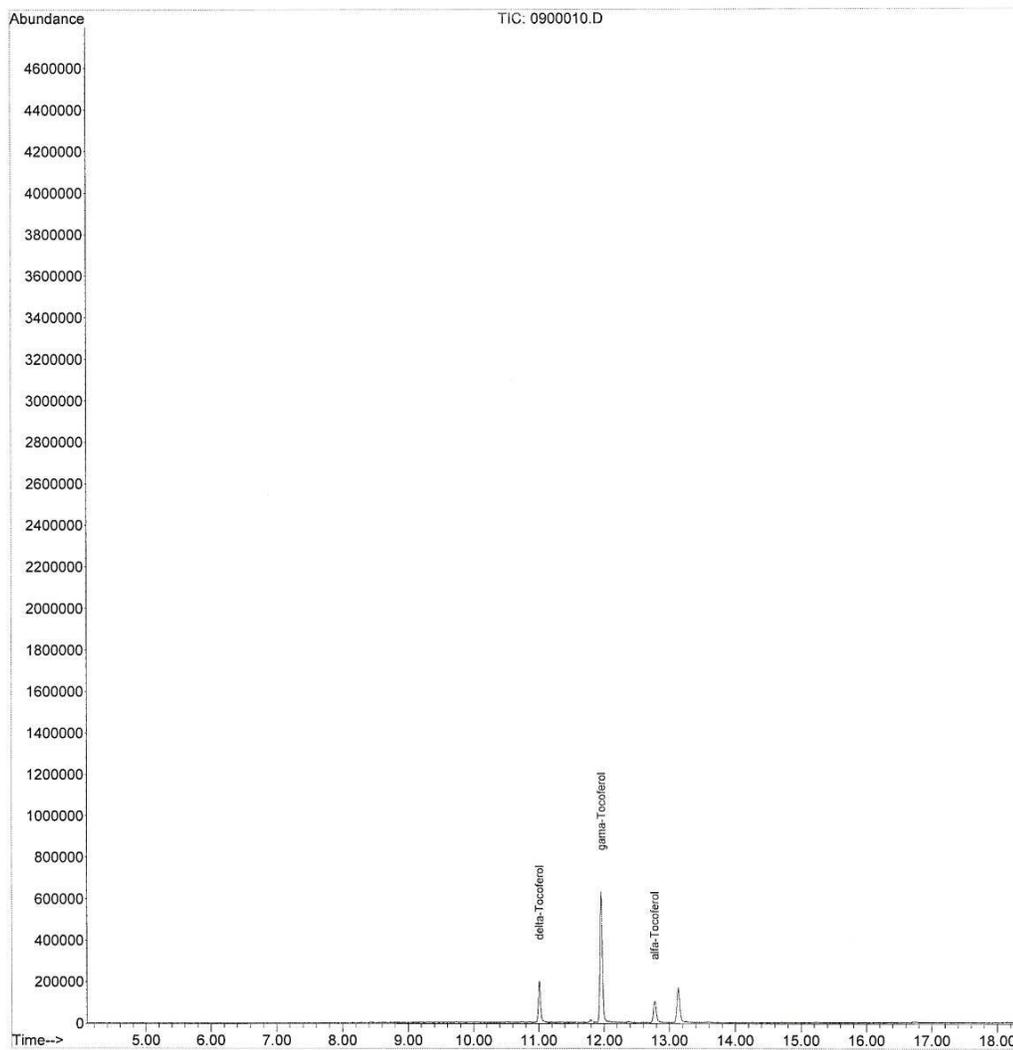
Target Compounds						Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.77	430	29957	14.62	mg/L	# 84
2) gama-Tocoferol	11.96	416	168095	57.57	mg/L	95
3) delta-Tocoferol	11.01	402	51843	21.00	mg/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
Data File : 0900010.D
Acq On : 13 Oct 2012 13:25
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : Muestra Val-06 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:01:39 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
Quant Title :
QLast Update : Mon Oct 29 19:36:54 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
 Data File : 1000011.D
 Acq On : 13 Oct 2012 13:46
 Operator :
 Sample : Mta-02
 Misc : Muestra Val-07 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:02:16 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
 Response via : Initial Calibration

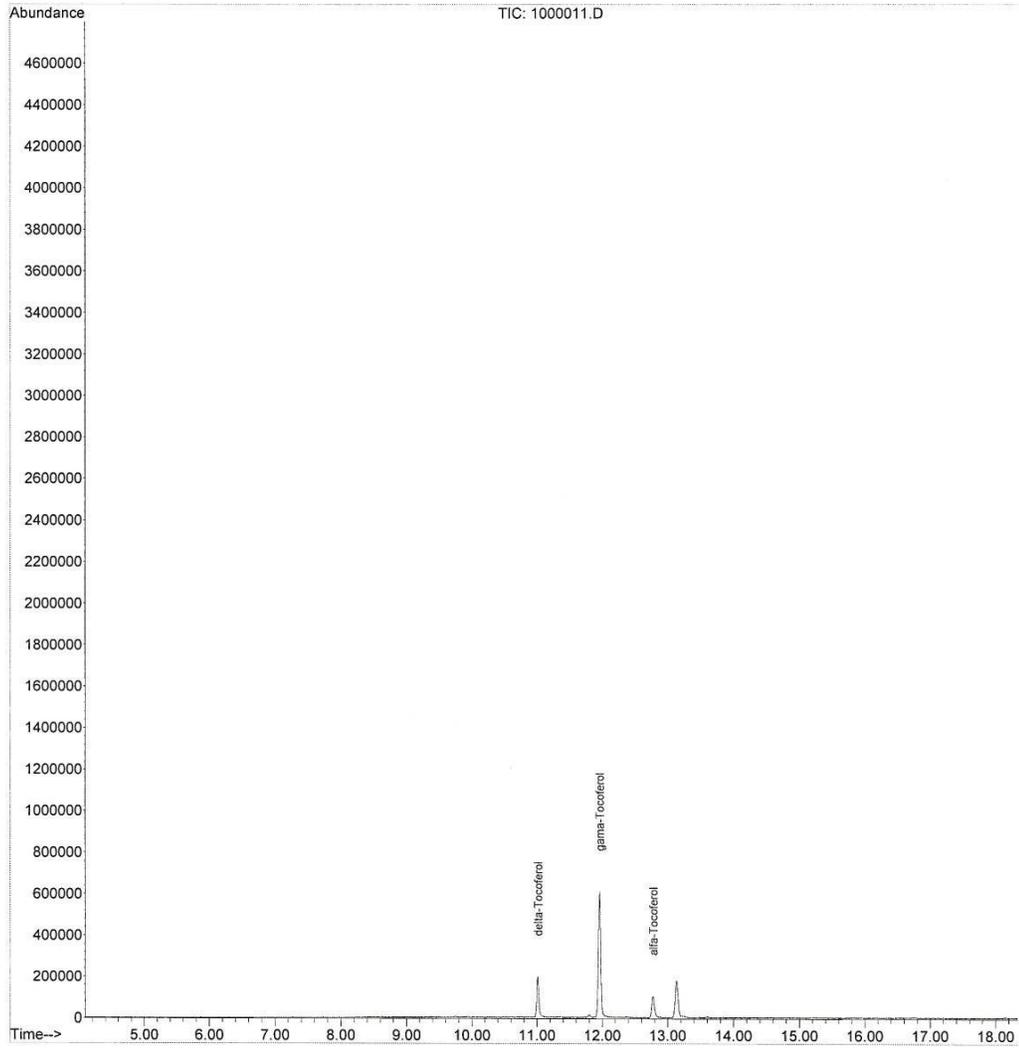
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	Qvalue
Target Compounds							
1) alfa-Tocoferol	12.78	430	29442	14.39	mg/L		86
2) gama-Tocoferol	11.96	416	164791	56.45	mg/L #		2
3) delta-Tocoferol	11.01	402	51332	20.79	mg/L		93

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
Data File : 1000011.D
Acq On : 13 Oct 2012 13:46
Operator :
Sample : Mta-02
Misc : Muestra Val-07 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:02:16 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
 Data File : 1100012.D
 Acq On : 13 Oct 2012 14:07
 Operator :
 Sample : Mta-03
 Misc : Muestra Val-08 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:02:44 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

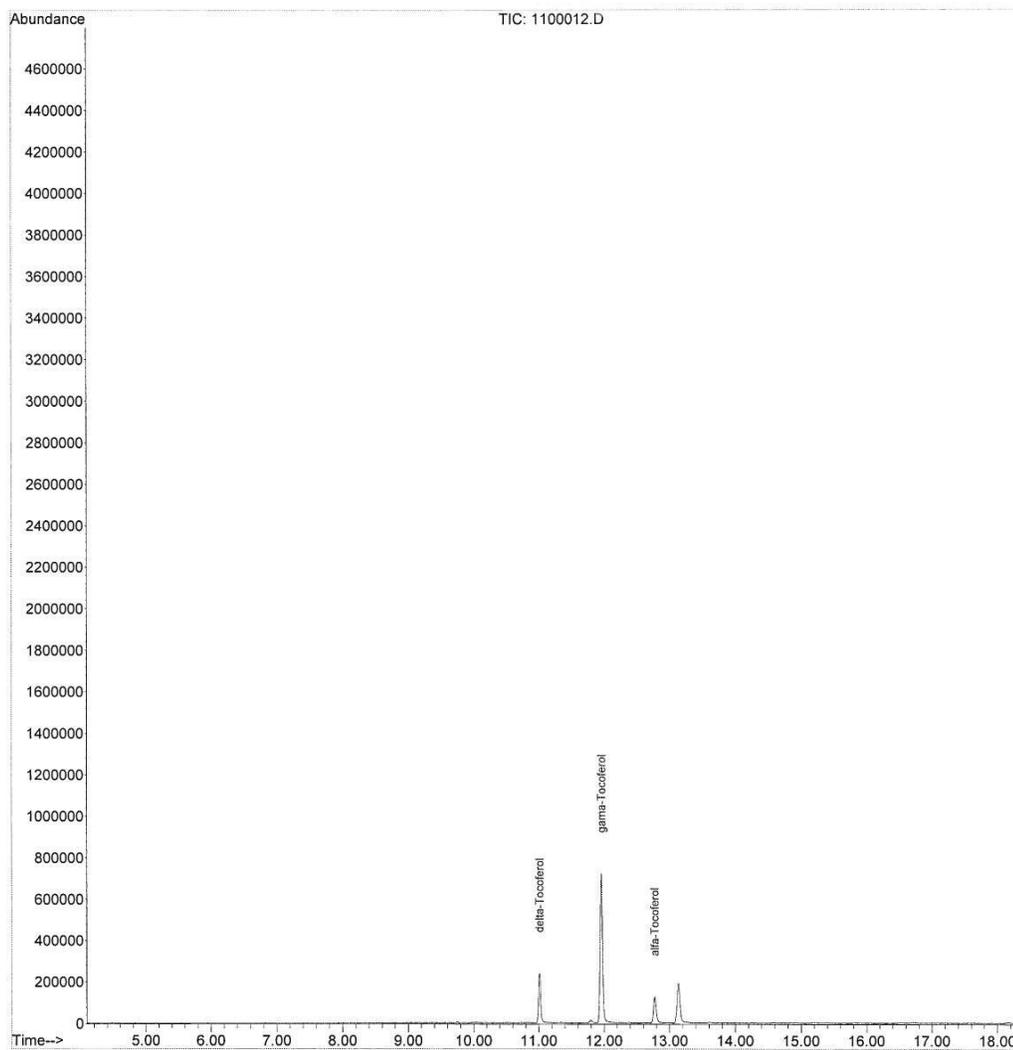
Target Compounds							Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.78	430	37243	17.79	mg/L		83
2) gama-Tocoferol	11.96	416	191010	65.27	mg/L #		2
3) delta-Tocoferol	11.01	402	61400	24.82	mg/L		93

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
Data File : 1100012.D
Acq On : 13 Oct 2012 14:07
Operator :
Sample : Mta-03
Misc : Muestra Val-08 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:02:44 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
 Data File : 1200013.D
 Acq On : 13 Oct 2012 14:29
 Operator :
 Sample : Mta-04
 Misc : Muestra Val-09 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:03:08 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

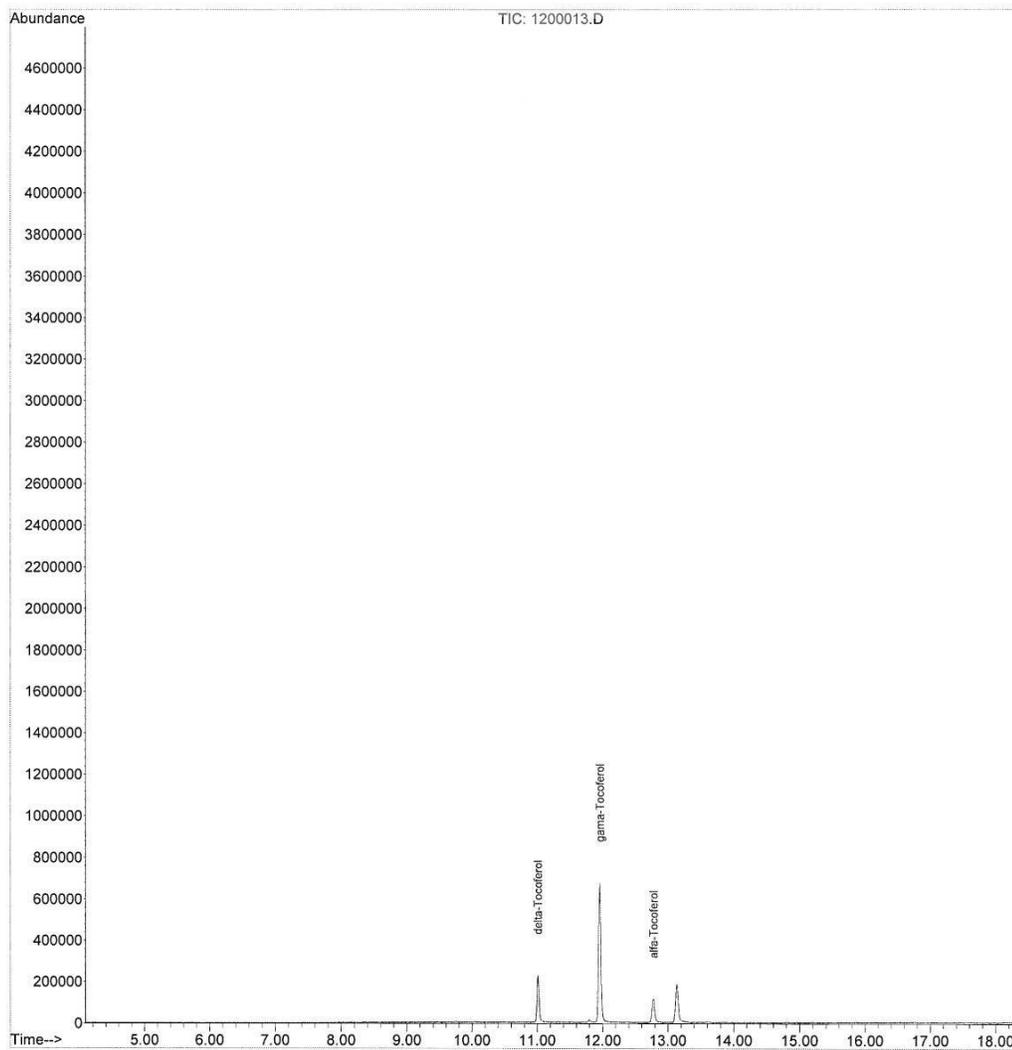
Target Compounds							Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.77	430	34722	16.69	mg/L	#	80
2) gama-Tocoferol	11.96	416	181274	61.99	mg/L	#	2
3) delta-Tocoferol	11.01	402	56886	23.01	mg/L		97

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
Data File : 1200013.D
Acq On : 13 Oct 2012 14:29
Operator :
Sample : Mta-04
Misc : Muestra Val-09 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:03:08 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
 Data File : 1300014.D
 Acq On : 13 Oct 2012 14:51
 Operator :
 Sample : Mta-05
 Misc : Muestra Val-10 Mix Tocoferoles
 ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:03:31 2012
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
 Quant Title :
 QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	

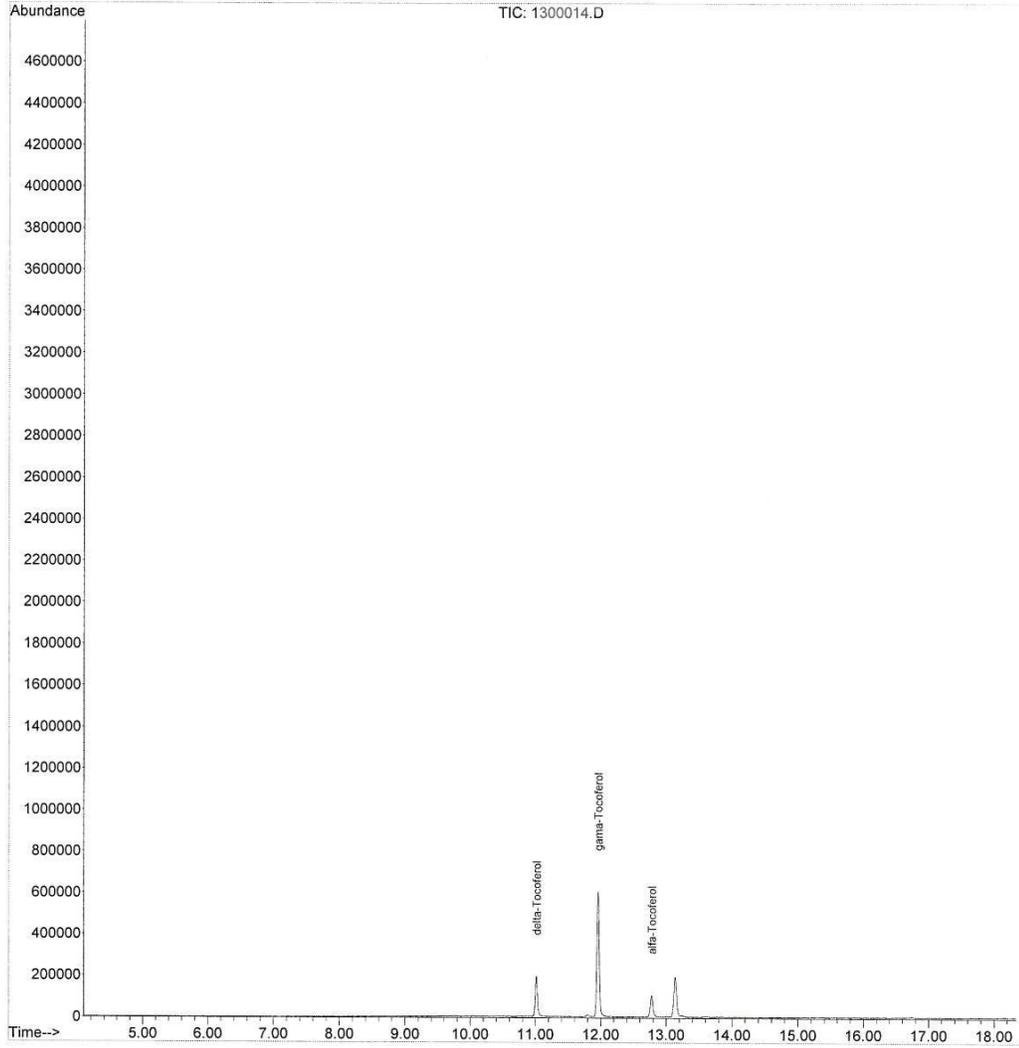
Target Compounds							Qvalue
1) alfa-Tocoferol	12.78	430	30744	14.96	mg/L		87
2) gama-Tocoferol	11.96	416	164482	56.35	mg/L #		2
3) delta-Tocoferol	11.02	402	49444	20.04	mg/L		95

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\13\
Data File : 1300014.D
Acq On : 13 Oct 2012 14:51
Operator :
Sample : Mta-05
Misc : Muestra Val-10 Mix Tocoferoles
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 30 23:03:31 2012
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCOFE20121013.M
Quant Title :
QLast Update : Tue Oct 30 22:01:17 2012
Response via : Initial Calibration



Anexo IV.

Reportes de Análisis de Tocoferoles.

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1000018.D
Acq On : 4 Oct 2013 20:14
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : 0.5974g/10ml-0.01ml/10ml
ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 21 17:07:17 2014
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

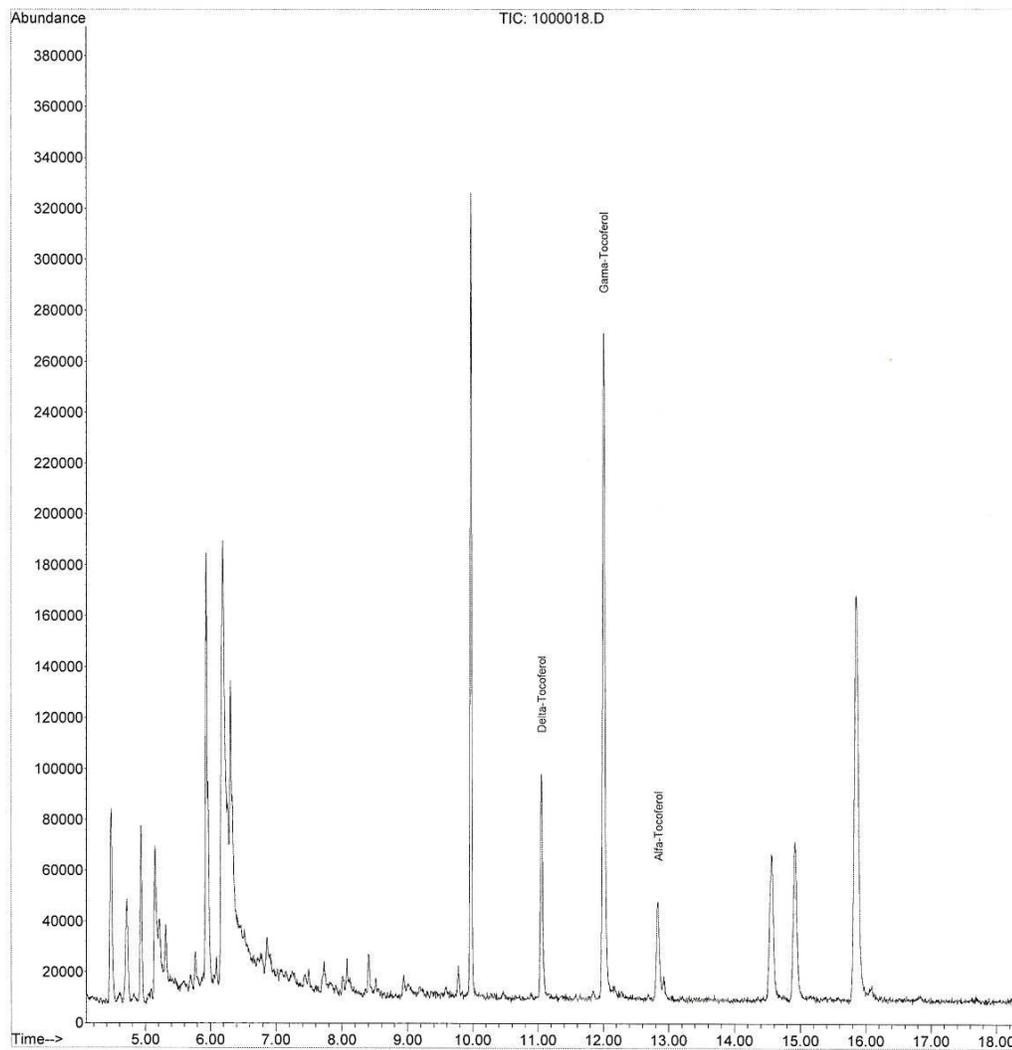
Target Compounds						Qvalue
1) Delta-Tocoferol	11.05	402	26706	17.42	mg/L	97
2) Gama-Tocoferol	12.01	416	99394	37.02	mg/L	96
3) Alfa-Tocoferol	12.84	430	18822	8.79	mg/L	97

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1000018.D
Acq On : 4 Oct 2013 20:14
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : 0.5974g/10ml-0.01ml/10ml
ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 21 17:07:17 2014
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1100019.D
 Acq On : 4 Oct 2013 20:36
 Operator :
 Sample : Mta-02
 Misc : 0.5805g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:42:42 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

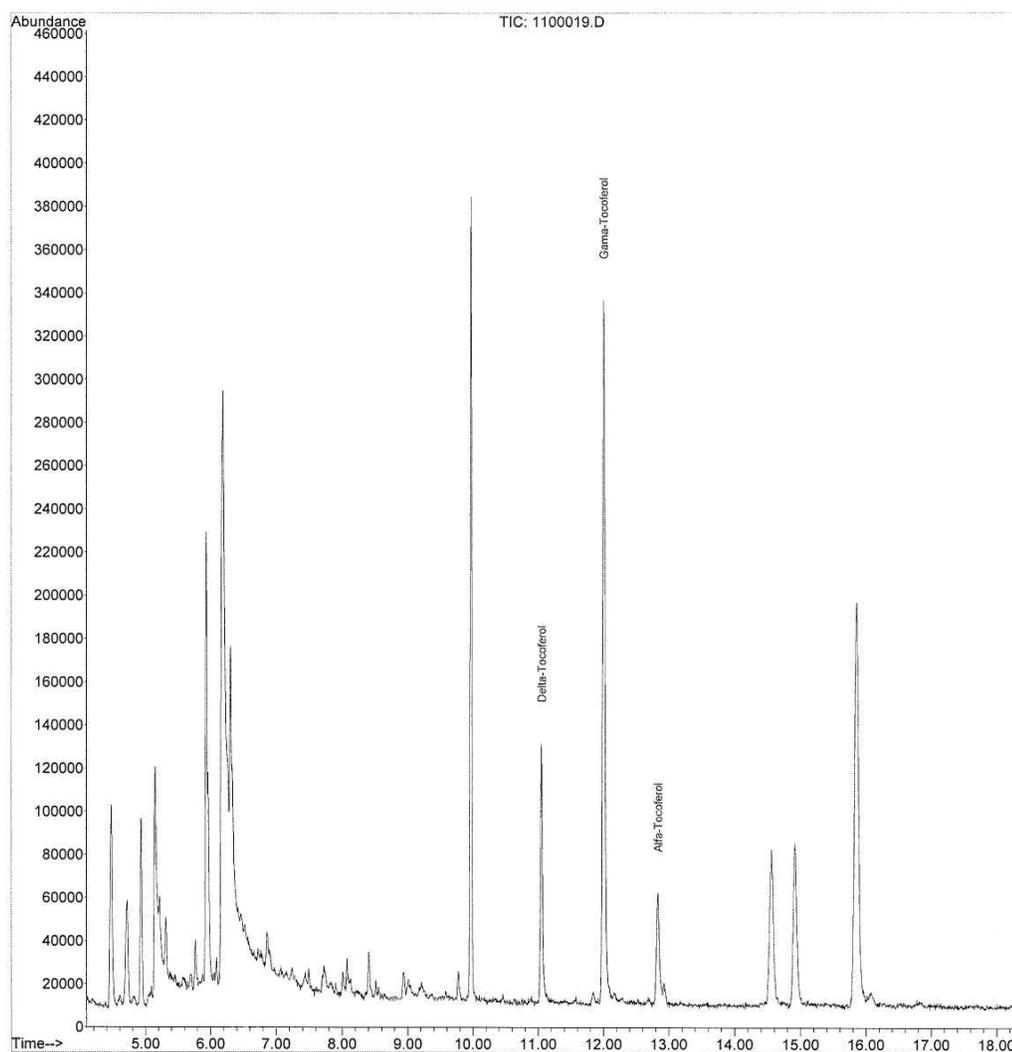
Target Compounds						Qvalue
1) Delta-Tocopherol	11.05	402	34326	22.39	mg/L	95
2) Gama-Tocopherol	12.01	416	121890	45.40	mg/L	94
3) Alfa-Tocopherol	12.83	430	23553	11.00	mg/L	98

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1100019.D
Acq On : 4 Oct 2013 20:36
Operator :
Sample : Mta-02
Misc : 0.5805g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 11 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:42:42 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1200020.D
 Acq On : 4 Oct 2013 20:59
 Operator :
 Sample : Mta-03
 Misc : 0.5692g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:43:34 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	Qvalue

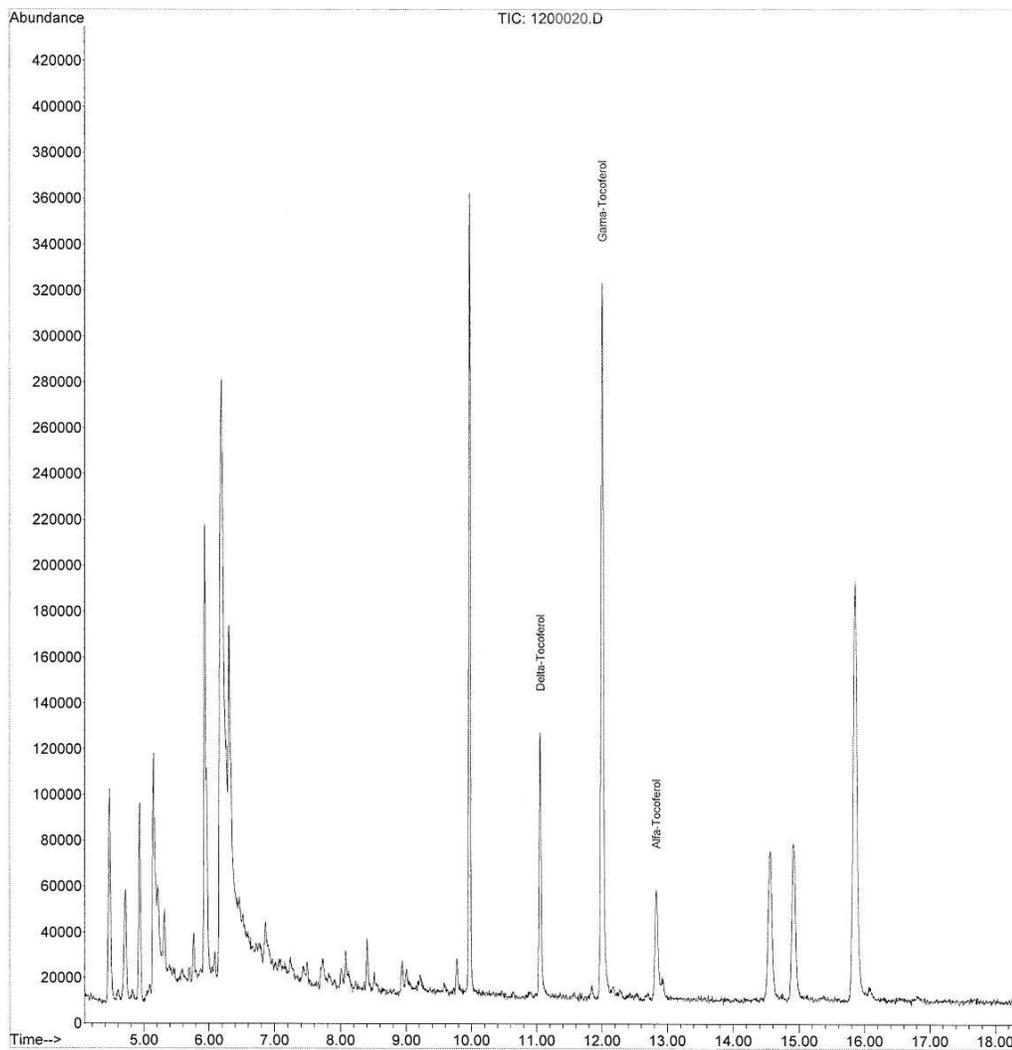
Target Compounds							
1) Delta-Tocopherol	11.05	402	31949	20.84	mg/L		98
2) Gama-Tocopherol	12.00	416	115799	43.13	mg/L		97
3) Alfa-Tocopherol	12.83	430	22479	10.50	mg/L		98

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1200020.D
Acq On : 4 Oct 2013 20:59
Operator :
Sample : Mta-03
Misc : 0.5692g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:43:34 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1300021.D
 Acq On : 4 Oct 2013 21:22
 Operator :
 Sample : Mta-04
 Misc : 0.5900g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:44:33 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

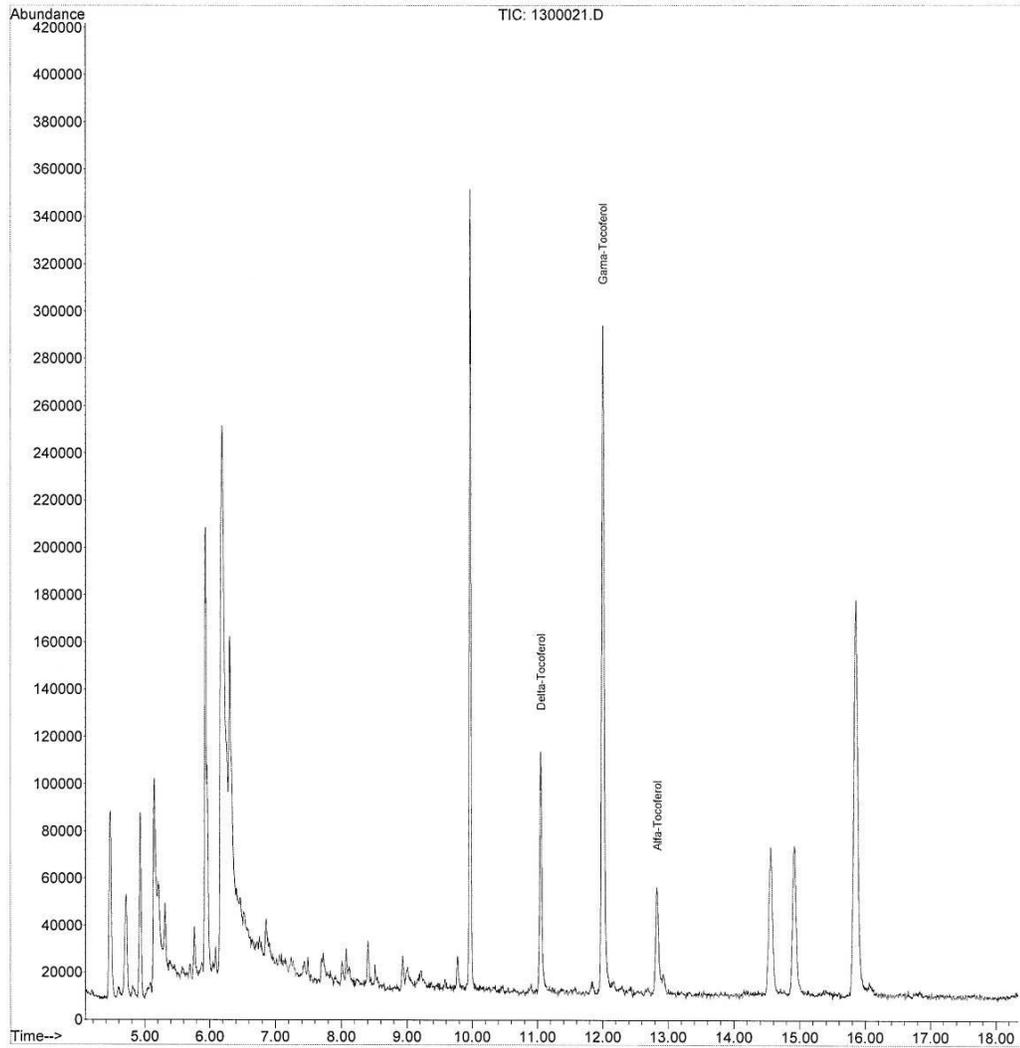
Target Compounds						Qvalue
1) Delta-Tocoferol	11.05	402	30704	20.02	mg/L	96
2) Gama-Tocoferol	12.01	416	107000	39.85	mg/L	98
3) Alfa-Tocoferol	12.84	430	20773	9.70	mg/L	97

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1300021.D
Acq On : 4 Oct 2013 21:22
Operator :
Sample : Mta-04
Misc : 0.5900g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:44:33 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1400022.D
 Acq On : 4 Oct 2013 21:44
 Operator :
 Sample : Mta-05
 Misc : 0.5909g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 14 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:45:43 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	Qvalue

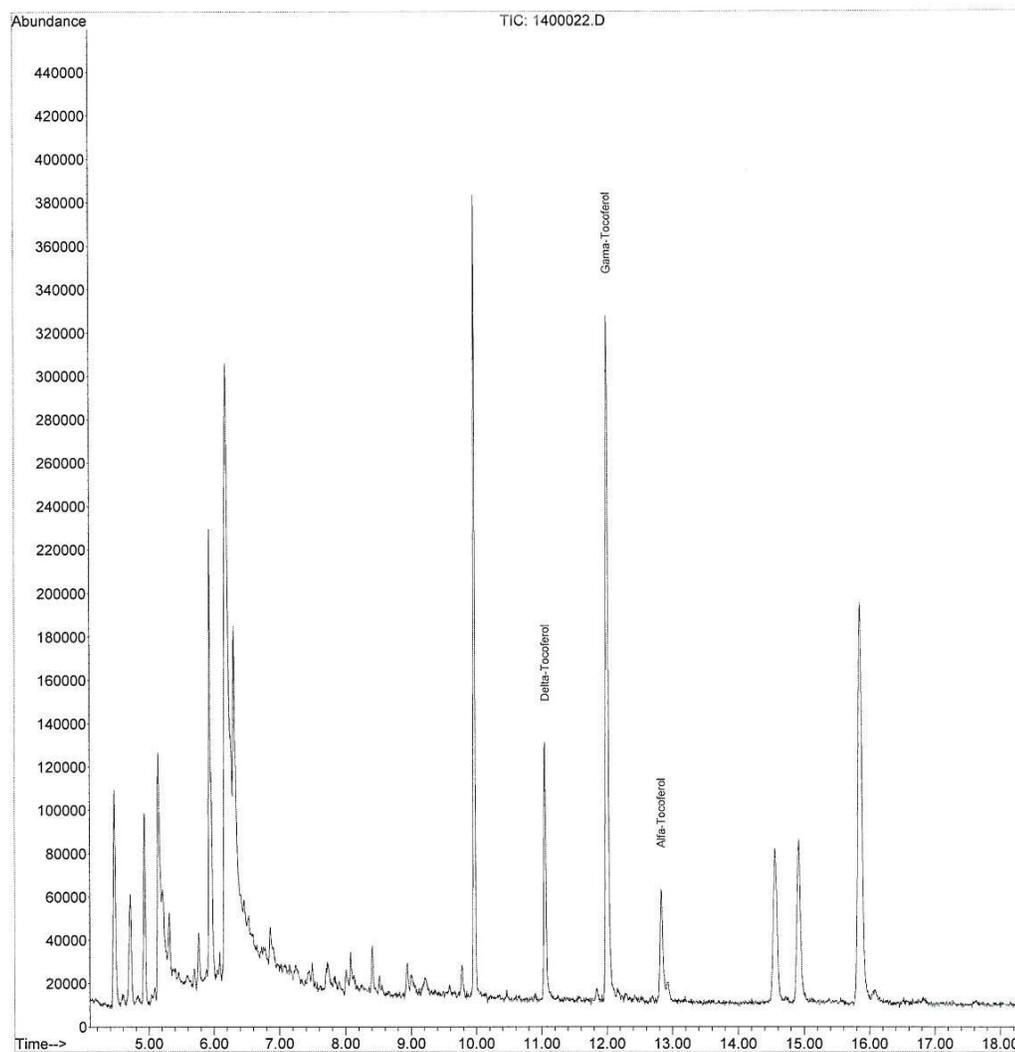
Target Compounds							Qvalue
1) Delta-Tocopherol	11.05	402	34230	22.32	mg/L		99
2) Gama-Tocopherol	12.01	416	119251	44.42	mg/L		96
3) Alfa-Tocopherol	12.83	430	22907	10.70	mg/L		98

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1400022.D
Acq On : 4 Oct 2013 21:44
Operator :
Sample : Mta-05
Misc : 0.5909g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 14 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:45:43 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1500024.D
 Acq On : 4 Oct 2013 22:30
 Operator :
 Sample : Mta-01
 Misc : 0.6064g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 15 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:47:10 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

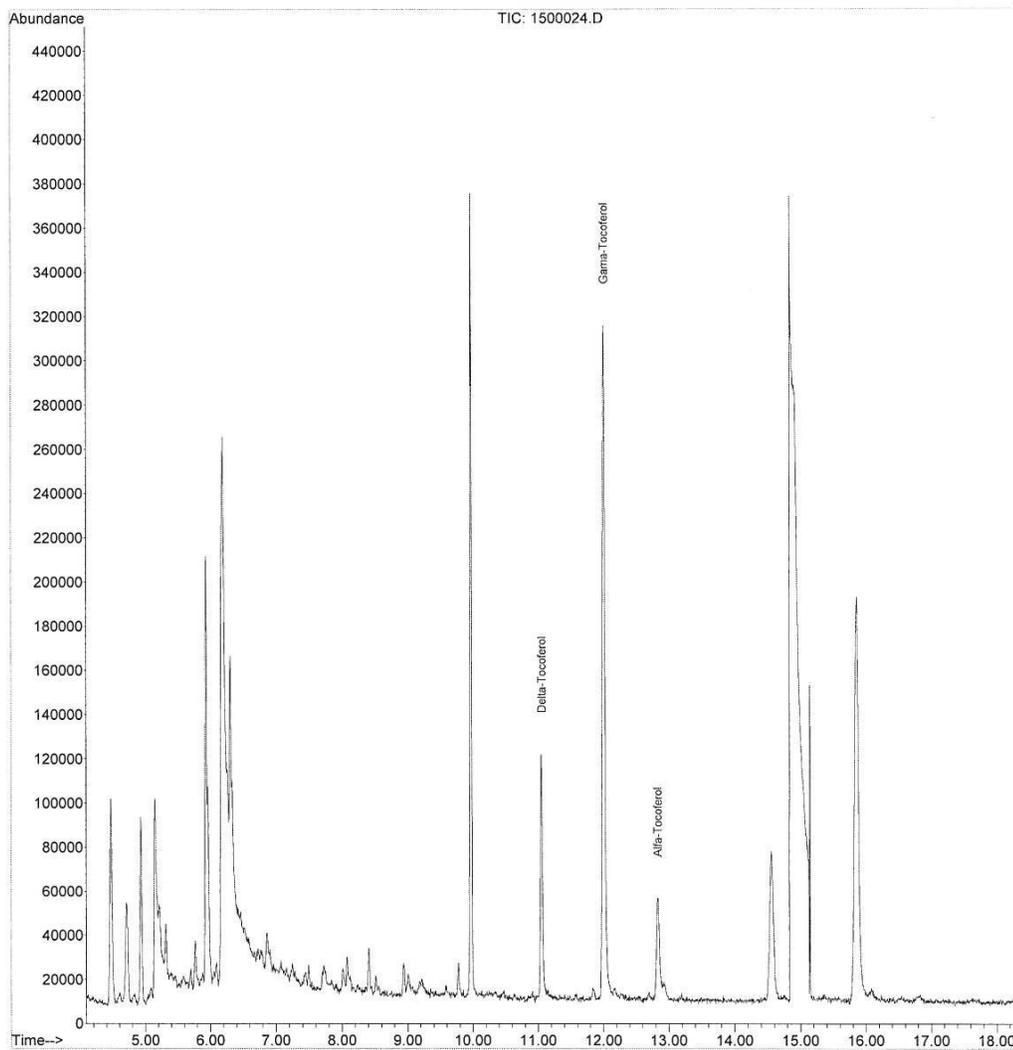
Target Compounds						Qvalue
1) Delta-Tocoferol	11.05	402	31933	20.83	mg/L	99
2) Gama-Tocoferol	12.01	416	114577	42.68	mg/L	98
3) Alfa-Tocoferol	12.83	430	21399	10.00	mg/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1500024.D
Acq On : 4 Oct 2013 22:30
Operator :
Sample : Mta-01
Misc : 0.6064g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 15 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:47:10 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1600025.D
 Acq On : 4 Oct 2013 22:51
 Operator :
 Sample : Mta-02
 Misc : 0.6084g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 16 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:49:13 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

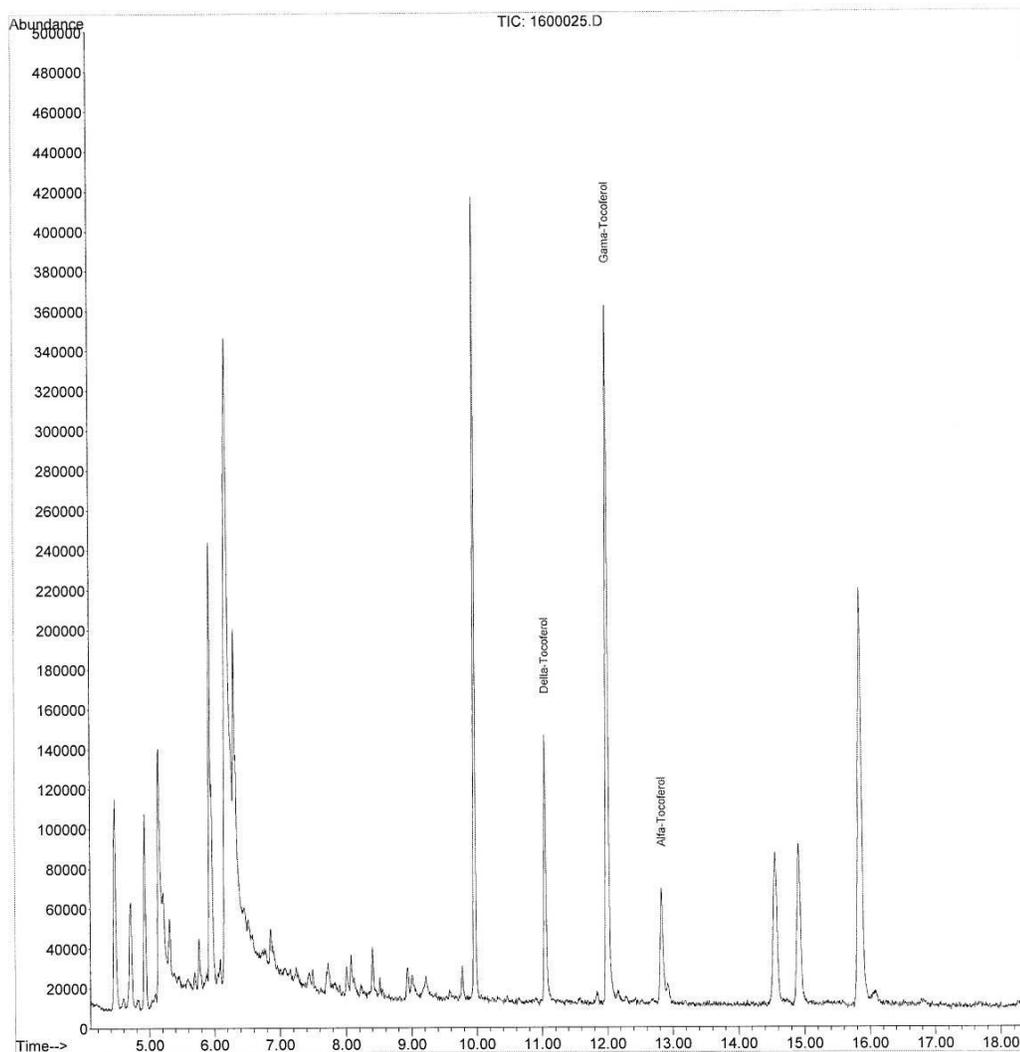
Target Compounds						Qvalue
1) Delta-Tocopherol	11.05	402	36983	24.12	mg/L	99
2) Gama-Tocopherol	12.00	416	131714	49.06	mg/L	94
3) Alfa-Tocopherol	12.83	430	25785	12.05	mg/L	100

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1600025.D
Acq On : 4 Oct 2013 22:51
Operator :
Sample : Mta-02
Misc : 0.6084g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 16 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:49:13 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1600025.D
 Acq On : 4 Oct 2013 22:51
 Operator :
 Sample : Mta-02
 Misc : 0.6084g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 16 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:49:13 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)

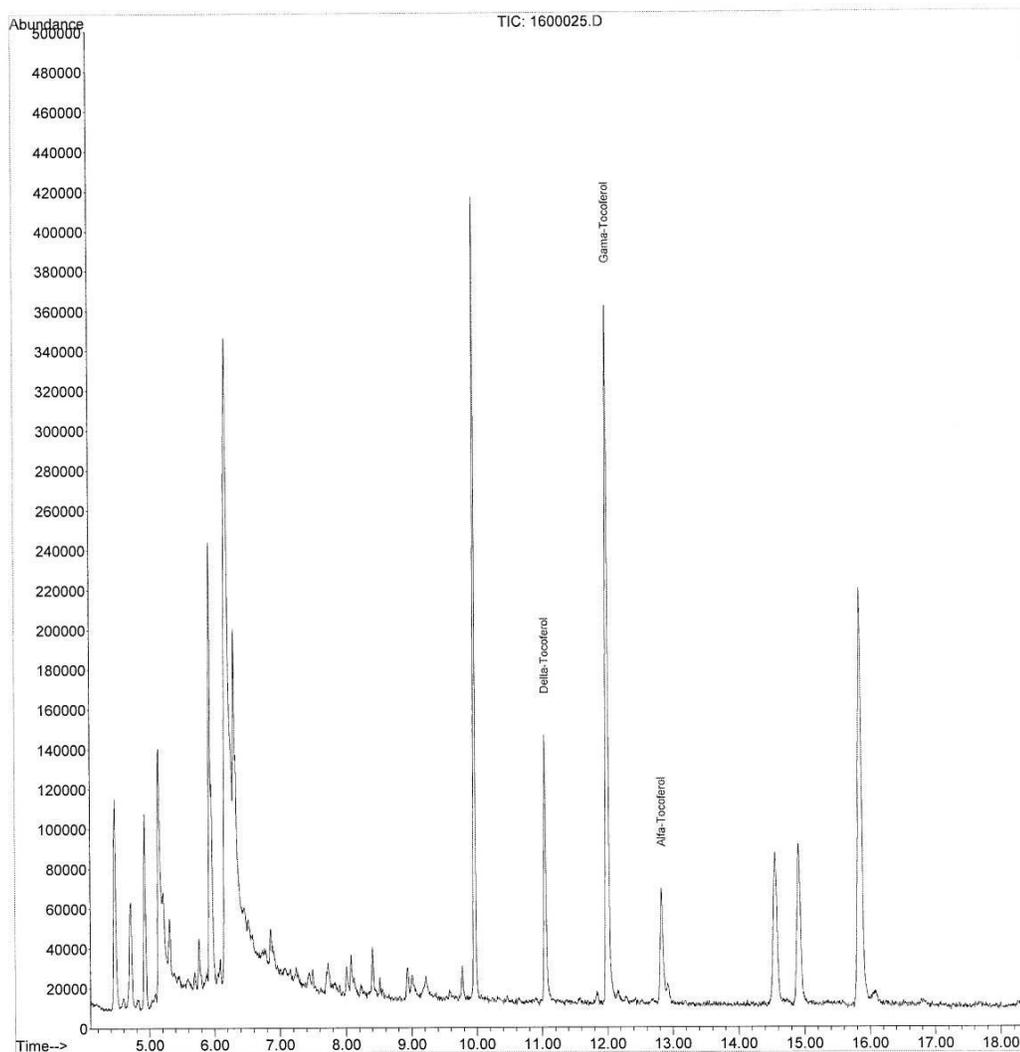
Target Compounds						Qvalue
1) Delta-Tocopherol	11.05	402	36983	24.12	mg/L	99
2) Gama-Tocopherol	12.00	416	131714	49.06	mg/L	94
3) Alfa-Tocopherol	12.83	430	25785	12.05	mg/L	100

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1600025.D
Acq On : 4 Oct 2013 22:51
Operator :
Sample : Mta-02
Misc : 0.6084g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 16 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:49:13 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration



Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
 Data File : 1700026.D
 Acq On : 4 Oct 2013 23:13
 Operator :
 Sample : Mta-03
 Misc : 0.6063g/10ml-0.01/10ml
 ALS Vial : 17 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 19 11:50:02 2013
 Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
 Quant Title :
 QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
 Response via : Initial Calibration

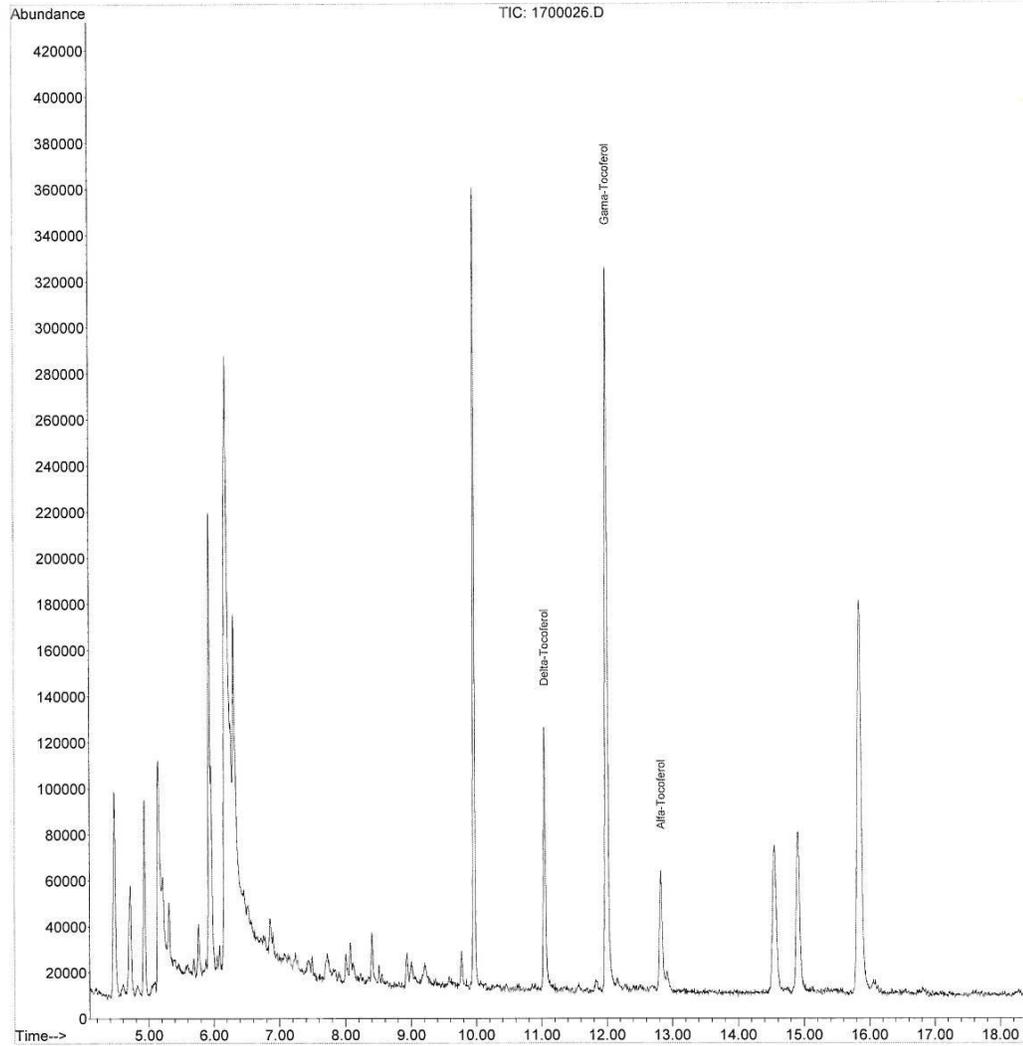
Internal Standards	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)	Qvalue
Target Compounds							
1) Delta-Tocopherol	11.05	402	31756	20.71	mg/L		98
2) Gama-Tocopherol	12.00	416	114923	42.81	mg/L		98
3) Alfa-Tocopherol	12.82	430	23559	11.01	mg/L		97

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

Quantitation Report (Not Reviewed)

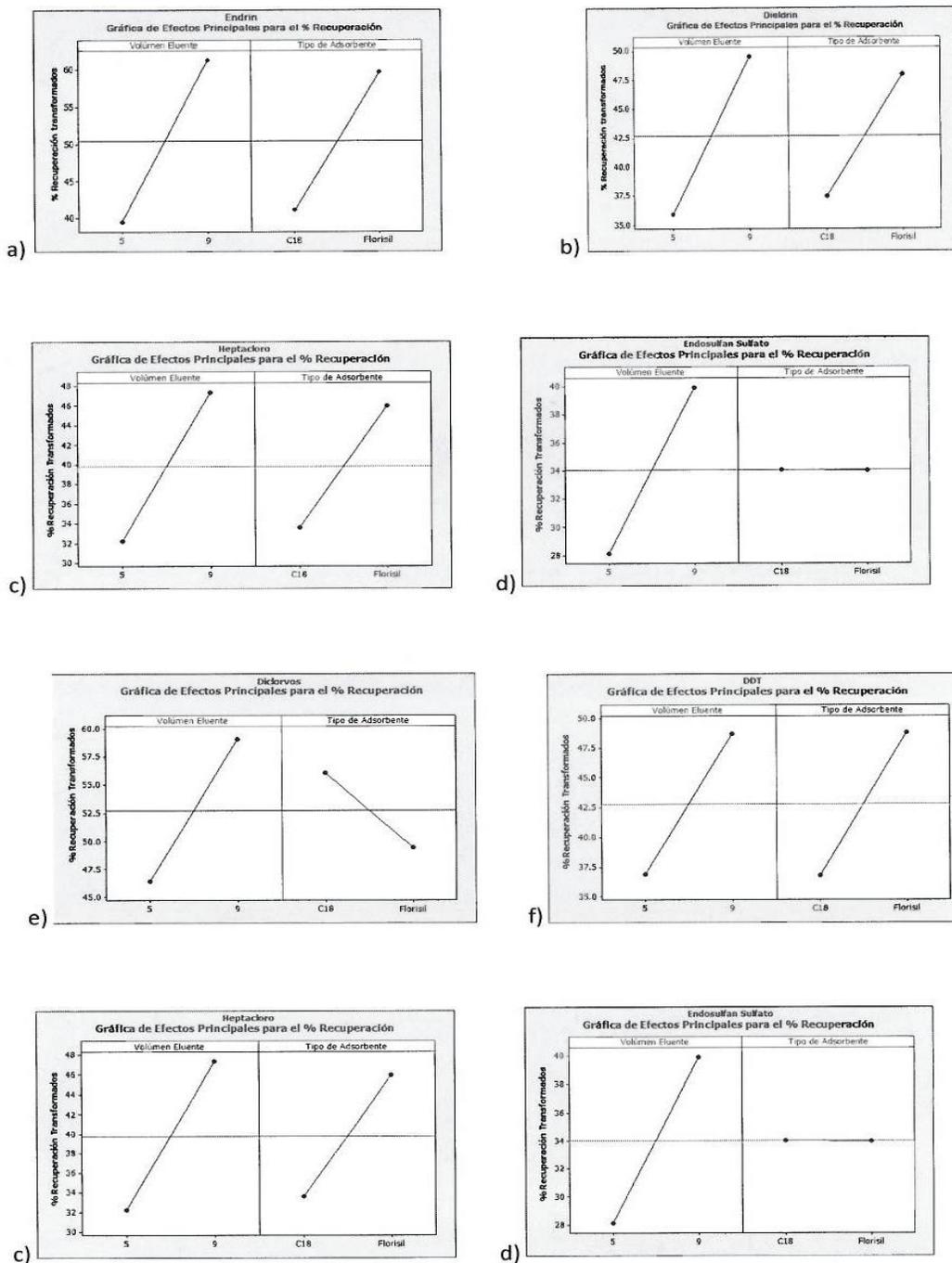
Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Oct\04a\
Data File : 1700026.D
Acq On : 4 Oct 2013 23:13
Operator :
Sample : Mta-03
Misc : 0.6063g/10ml-0.01/10ml
ALS Vial : 17 Sample Multiplier: 1

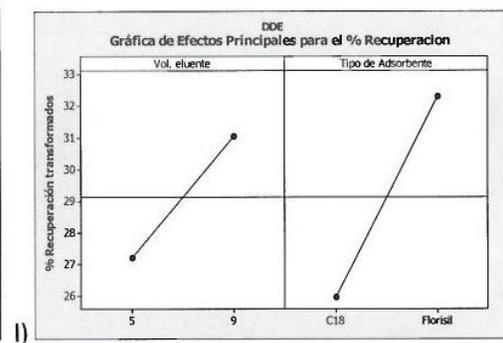
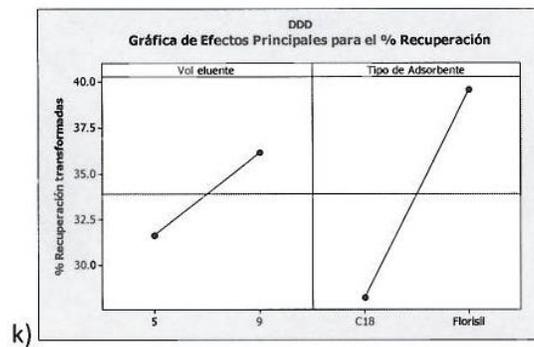
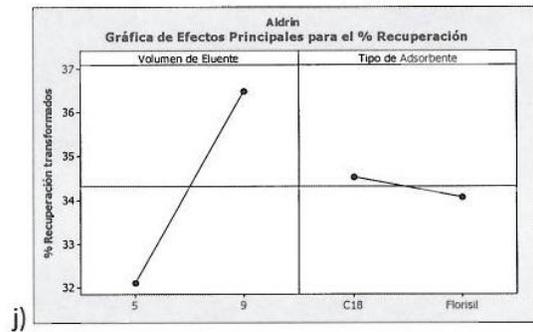
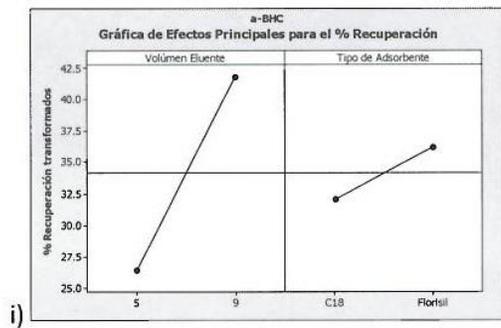
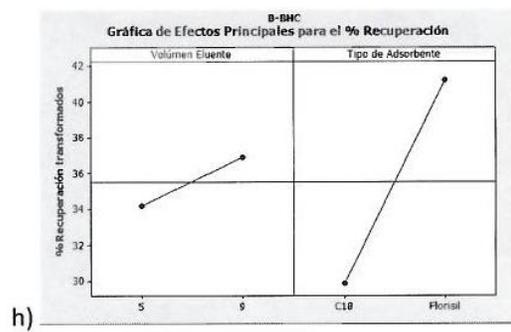
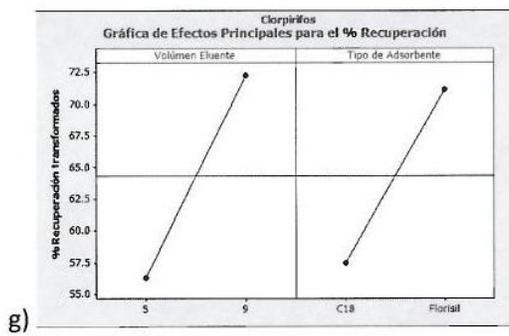
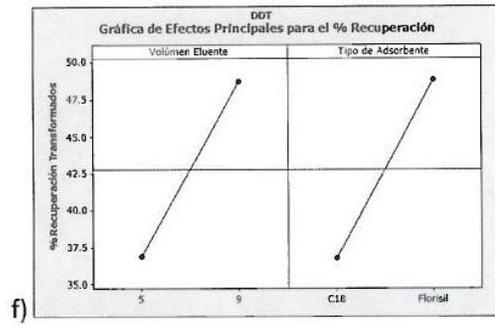
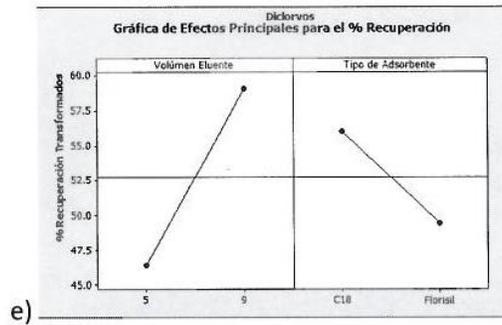
Quant Time: Oct 19 11:50:02 2013
Quant Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\TOCO20131016.M
Quant Title :
QLast Update : Sat Oct 19 11:19:00 2013
Response via : Initial Calibration

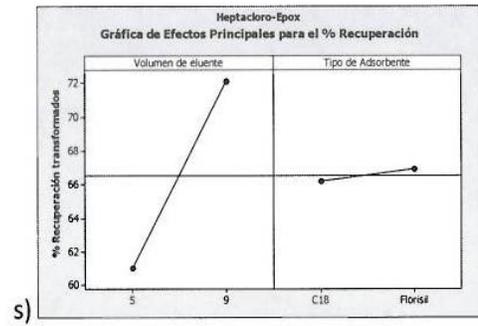
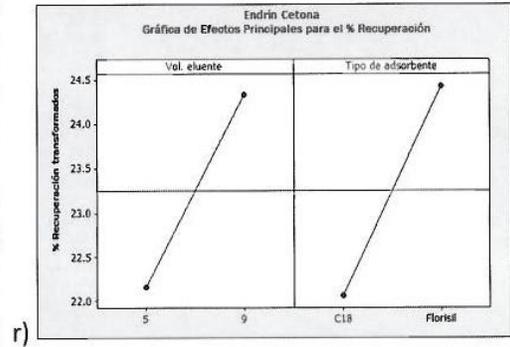
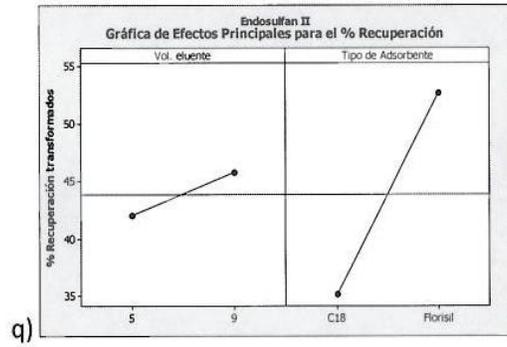
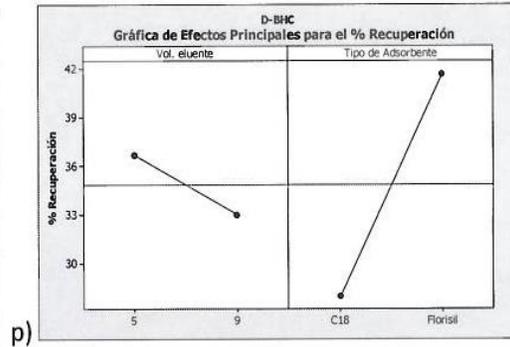
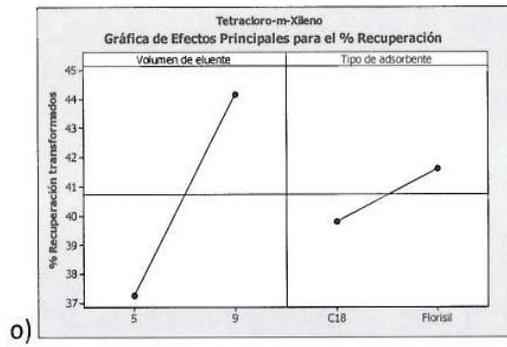
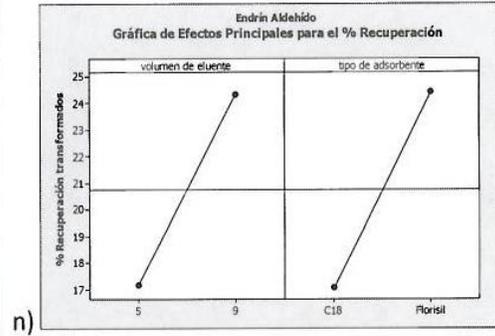
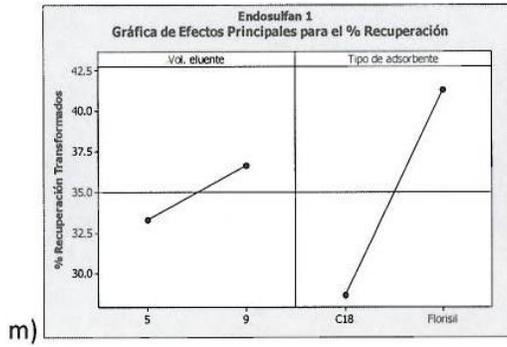


ANEXO V.

Gráficas de efectos principales para el análisis de plaguicidas.







Anexo VI.

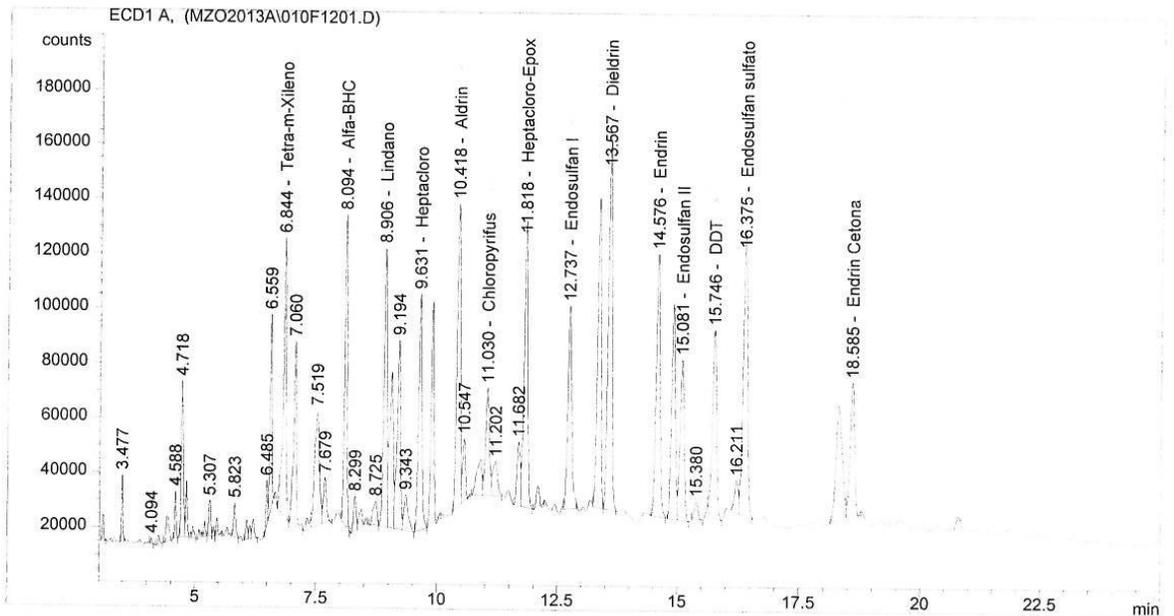
Reportes del Diseño factorial para plaguicidas.

Data File D:\HPCHEM\1\DATA\MZO2013A\010F1201.D

Sample Name: Mta-02

5ml C18

```
=====
Injection Date   : 3/20/13 10:51:58 PM           Seq. Line : 12
Sample Name     : Mta-02                         Vial      : 10
Acq. Operator   : JRR                           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 1 µl
Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL.M
Last changed    : 3/20/13 4:02:54 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL01A.M
Last changed    : 3/21/13 1:11:30 PM by JRR
                  (modified after loading)
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608.
=====
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      3/21/13 1:09:02 PM
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.821	VB	4.49102e4	1.85030e-5	8.30972e-1		Diclorvos ✓
6.844	PP	4.29690e5	6.21990e-7	2.67263e-1		Tetra-m-Xileno ✓
8.094	BB	4.05351e5	1.02854e-6	4.16918e-1		Alfa-BHC
8.906	VV	4.41089e5	1.17429e-6	5.17964e-1		Lindano
9.044	VV	3.14869e5	1.92694e-6	6.06735e-1		Beta-BHC
9.631	BP	4.12332e5	1.08687e-6	4.48153e-1		Heptacloro
9.885	VB	3.31014e5	1.29921e-6	4.30057e-1		Delta BHC
10.418	BV	5.37922e5	5.28235e-7	2.84149e-1		Aldrin ✓
11.030	VV	2.10453e5	2.85572e-6	6.00994e-1		Chloropyrifus ✗
11.818	VB	5.63382e5	8.43951e-7	4.75467e-1		Heptacloro-Epox
12.737	BB	4.22288e5	1.06603e-6	4.50171e-1		Endosulfan I ✓
13.346	BP	5.93107e5	5.73991e-7	3.40438e-1		DDE
13.567	VP	7.58033e5	6.49749e-7	4.92532e-1		Dieldrin
14.576	PB	5.59462e5	9.46432e-7	5.29493e-1		Endrin
14.896	BV	4.38287e5	1.00069e-6	4.38589e-1		DDD
15.081	VP	3.47596e5	1.35709e-6	4.71718e-1		Endosulfan II
15.746	BP	4.21165e5	1.28316e-6	5.40422e-1		DDT ✓
16.038		-	-	-		Endrin aldehido
16.375	VB	6.52448e5	9.71348e-7	6.33755e-1		Endosulfan sulfato
18.307	BV	3.84201e5	3.16699e-6	1.21676		Metoxicloro
18.585	VB	3.14959e5	1.68011e-6	5.29166e-1		Endrin Cetona ✓
21.867		-	-	-		Decaclorobifenilo

```
Totals :                               10.52172
```

Results obtained with enhanced integrator!

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

```

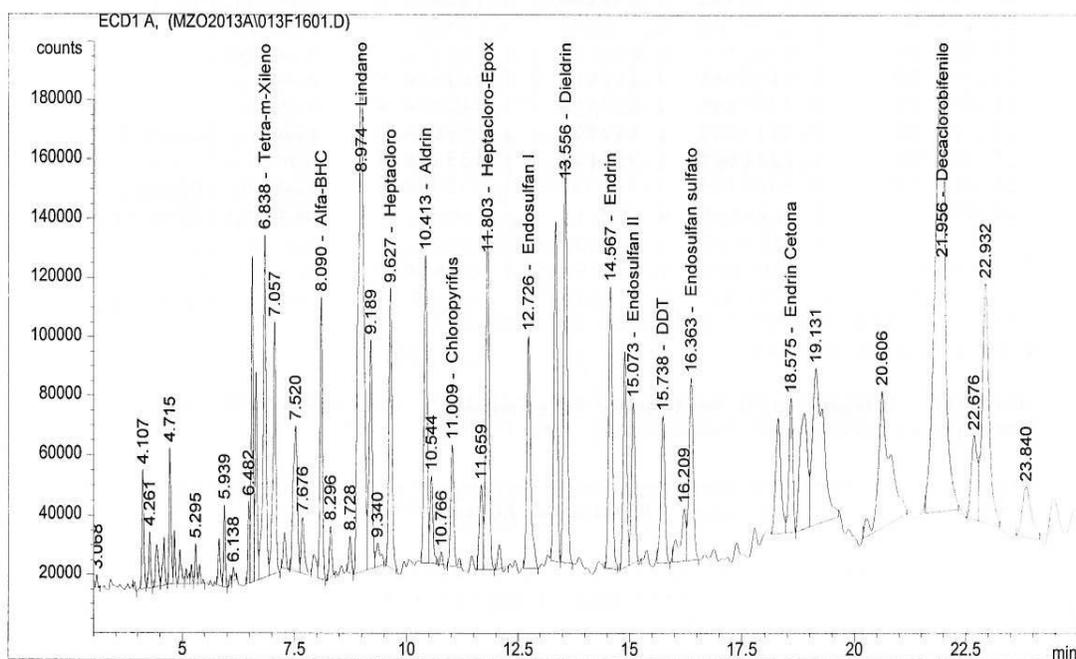
=====
*** End of Report ***
=====

```

9ml Florisil

```
=====
Injection Date : 3/21/13 1:19:44 AM          Seq. Line : 16
Sample Name    : Mta-05                      Vial       : 13
Acq. Operator  : JRR                        Inj        : 1
                                                Inj Volume : 1 µl
Acq. Method    : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL.M
Last changed   : 3/20/13 4:02:54 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL01A.M
Last changed   : 3/21/13 1:11:30 PM by JRR
                (modified after loading)
```

METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608.



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :    3/21/13  1:09:02 PM
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.820	VB	4.06968e4	1.84886e-5	7.52427e-1		Di chlorvos
6.838	VV	5.30075e5	6.36450e-7	3.37366e-1		Tetra-m-Xileno
8.090	BB	3.48881e5	1.01044e-6	3.52521e-1		Alfa-BHC
8.974	VV	1.54046e6	1.20336e-6	1.85372		Lindano
9.065		-	-	-		Beta-BHC
9.627	BB	4.50771e5	1.09183e-6	4.92167e-1		Heptacloro
9.906		-	-	-		Delta BHC
10.413	BV	5.15479e5	5.26540e-7	2.71420e-1		Aldrin
11.009	BB	2.05345e5	2.85044e-6	5.85322e-1		Chloropyrifus
11.803	VB	6.19466e5	8.48015e-7	5.25317e-1		Heptacloro-Epox
12.726	BP	4.77787e5	1.07518e-6	5.13707e-1		Endosulfan I
13.336	BV	6.12387e5	5.76057e-7	3.52769e-1		DDE
13.556	VB	7.53818e5	6.49612e-7	4.89689e-1		Dieldrin
14.567	PB	5.54569e5	9.46151e-7	5.24705e-1		Endrin
14.888	PV	3.97559e5	9.91731e-7	3.94272e-1		DDD
15.073	VB	3.09336e5	1.34373e-6	4.15665e-1		Endosulfan II
15.738	BP	3.12443e5	1.29849e-6	4.05703e-1		DDT
16.038		-	-	-		Endrin aldehido
16.363	VB	4.01288e5	9.65761e-7	3.87549e-1		Endosulfan sulfato
18.291	PV	3.14595e5	3.15970e-6	9.94025e-1		Metoxicloro
18.575	VP	2.64832e5	1.65835e-6	4.39183e-1		Endrin Cetona
21.956	BB	2.62647e6	7.74864e-7	2.03516		Decaclorobifenilo

```
Totals :                               12.12269
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :
```

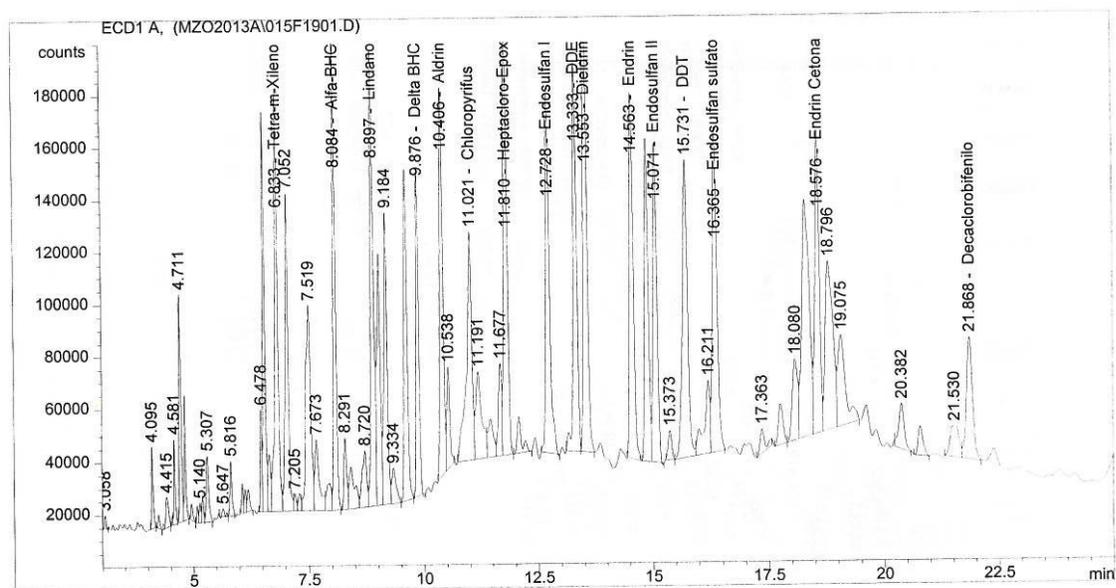
```
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
```

```
=====
*** End of Report ***
```

9ml C18

```
=====
Injection Date   : 3/21/13 3:10:34 AM           Seq. Line   : 19
Sample Name     : Mta-07                       Vial        : 15
Acq. Operator   : JRR                          Inj         : 1
                                           Inj Volume  : 1 µl

Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL.M
Last changed    : 3/20/13 4:02:54 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL01A.M
Last changed    : 3/21/13 1:11:30 PM by JRR
                  (modified after loading)
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608.
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      3/21/13 1:09:02 PM
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.816	VB	1.10699e5	1.85856e-5	2.05740		Diclorvos
6.833	VV	7.46085e5	6.54369e-7	4.88215e-1		Tetra-m-Xileno
8.084	VB	6.68197e5	1.07253e-6	7.16662e-1		Alfa-BHC
8.897	VV	8.15633e5	1.19299e-6	9.73045e-1		Lindano
9.037	VV	4.92465e5	1.97314e-6	9.71702e-1		Beta-BHC
9.618	VP	6.05736e5	1.10544e-6	6.69607e-1		Heptacloro
9.876	VP	5.21081e5	1.34400e-6	7.00335e-1		Delta BHC
10.406	BV	7.34777e5	5.38665e-7	3.95798e-1		Aldrin
11.021	BV	6.91935e5	3.00350e-6	2.07823		Chloropyrifus
11.810	VP	9.46382e5	8.62115e-7	8.15890e-1		Heptacloro-Epox
12.728	PP	8.23896e5	1.10443e-6	9.09933e-1		Endosulfan I
13.333	BV	8.29217e5	5.92670e-7	4.91452e-1		DDE
13.553	VP	1.11869e6	6.57683e-7	7.35743e-1		Dieldrin
14.563	PB	8.24809e5	9.56672e-7	7.89072e-1		Endrin
14.886	PV	6.97508e5	1.03319e-6	7.20655e-1		DDD
15.071	VP	7.20464e5	1.41299e-6	1.01801		Endosulfan II
15.731	VB	8.84951e5	1.26008e-6	1.11511		DDT
16.038		-	-	-		Endrin aldehido
16.365	VB	8.52481e5	9.73443e-7	8.29842e-1		Endosulfan sulfato
18.300	VV	1.02051e6	3.18755e-6	3.25294		Metoxicloro
18.576	VV	7.85371e5	1.74896e-6	1.37358		Endrin Cetona
21.868	VB	4.30093e5	7.20812e-7	3.10016e-1		Decaclorobifenilo

```
Totals :                               21.41324
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :
```

```
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
```

```

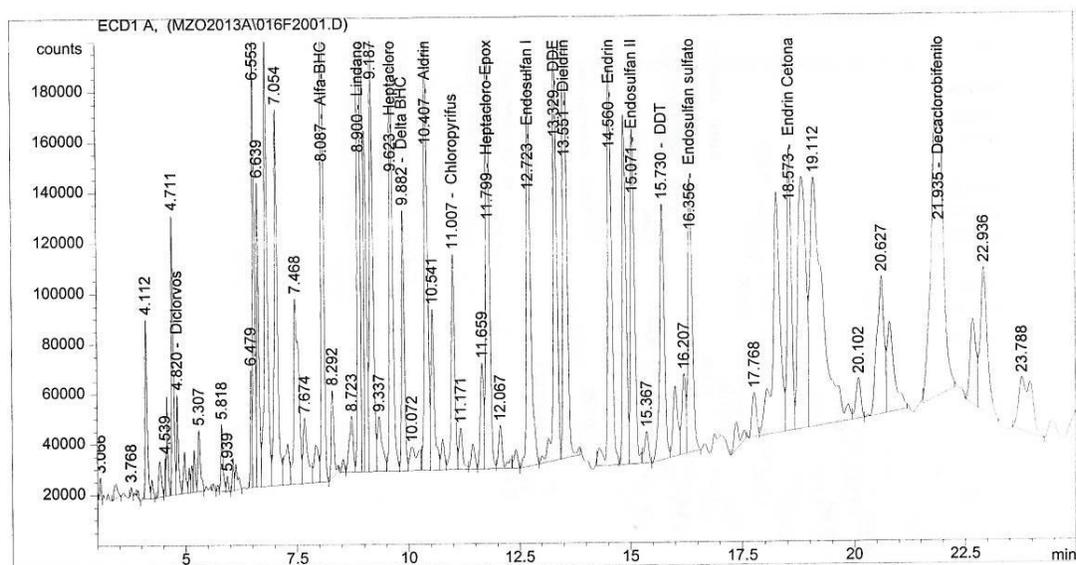
=====
*** End of Report ***
=====

```

9mlFlorisil

```
=====
Injection Date   : 3/21/13 3:47:33 AM           Seq. Line : 20
Sample Name      : Mta-08                       Vial       : 16
Acq. Operator    : JRR                          Inj        : 1
                                                    Inj Volume : 1 µl

Acq. Method      : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL.M
Last changed     : 3/20/13 4:02:54 PM by JRR
Analysis Method  : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL01A.M
Last changed     : 3/21/13 1:11:30 PM by JRR
                  (modified after loading)
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608.
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :    3/21/13 1:09:02 PM
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.820	VB	1.07939e5	1.85842e-5	2.00596		Di-clorvos
6.833	VV	8.63460e5	6.60347e-7	5.70183e-1		Tetra-m-Xileno
8.087	VP	1.01501e6	1.09571e-6	1.11216		Alfa-BHC
8.900	VV	9.94460e5	1.19696e-6	1.19032		Lindano
9.035	VV	5.27303e5	1.97855e-6	1.04330		Beta-BHC
9.623	VV	9.19555e5	1.11896e-6	1.02894		Heptacloro
9.882	VV	4.48045e5	1.33129e-6	5.96477e-1		Delta BHC
10.407	BV	9.02605e5	5.43964e-7	4.90985e-1		Aldrin
11.007	VV	4.56877e5	2.97027e-6	1.35705		Chloropyrifus
11.799	VV	1.08835e6	8.65600e-7	9.42074e-1		Heptacloro-Epox
12.723	VV	9.91244e5	1.11124e-6	1.10151		Endosulfan I
13.329	VV	9.69340e5	5.99453e-7	5.81074e-1		DDE
13.551	VB	1.28432e6	6.59833e-7	8.47440e-1		Dieldrin
14.560	BB	1.02200e6	9.60838e-7	9.81979e-1		Endrin
14.883	BV	7.84888e5	1.03930e-6	8.15737e-1		DDD
15.071	VB	8.19001e5	1.41925e-6	1.16237		Endosulfan II
15.730	VV	7.32000e5	1.26446e-6	9.25583e-1		DDT
16.007	VV	2.05803e5	1.49508e-6	3.07692e-1		Endrin aldehido
16.356	VP	7.22113e5	9.72210e-7	7.02045e-1		Endosulfan sulfato
18.283	VV	1.09286e6	3.18838e-6	3.48444		Metoxicloro
18.573	VV	7.31779e5	1.74558e-6	1.27738		Endrin Cetona
21.935	BB	2.57392e6	7.74648e-7	1.99388		Decaclorobifenilo

Totals : 24.51858

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

```

=====
*** End of Report ***
=====

```


=====
 External Standard Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 3/21/13 1:09:02 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.819	VB	1.73004e5	1.86059e-5	3.21889		Diclorvos
6.832	VV	6.90321e5	6.50817e-7	4.49273e-1		Tetra-m-Xileno
8.084	VP	8.58484e5	1.08757e-6	9.33661e-1		Alfa-BHC
8.895	VV	9.23368e5	1.19556e-6	1.10395		Lindano
9.035	VV	5.00568e5	1.97447e-6	9.88356e-1		Beta-BHC
9.618	VV	7.45856e5	1.11288e-6	8.30050e-1		Heptacloro
9.873	VB	6.49740e5	1.35945e-6	8.83288e-1		Delta BHC
10.403	BV	7.39757e5	5.38857e-7	3.98623e-1		Aldrin
11.017	VV	5.10886e5	2.98061e-6	1.52275		Chloropyrifus
11.804	VB	8.86821e5	8.60320e-7	7.62950e-1		Heptacloro-Epox
12.724	VP	8.48769e5	1.10561e-6	9.38408e-1		Endosulfan I
13.330	BP	7.81390e5	5.89798e-7	4.60863e-1		DDE
13.551	VB	1.02695e6	6.56193e-7	6.73874e-1		Dieldrin
14.560	PB	7.28223e5	9.53809e-7	6.94585e-1		Endrin
14.884	PV	6.69047e5	1.03085e-6	6.89686e-1		DDD
15.069	VP	6.95046e5	1.41108e-6	9.80764e-1		Endosulfan II
15.732	VP	6.95891e5	1.26577e-6	8.80840e-1		DDT
16.038		-	-	-		Endrin aldehido
16.358	VP	7.75878e5	9.72769e-7	7.54750e-1		Endosulfan sulfato
18.299	BV	7.65476e5	3.18342e-6	2.43683		Metoxicloro
18.573	VB	7.04818e5	1.74369e-6	1.22898		Endrin Cetona
21.867		-	-	-		Decaclorobifenilo

Totals : 20.83137

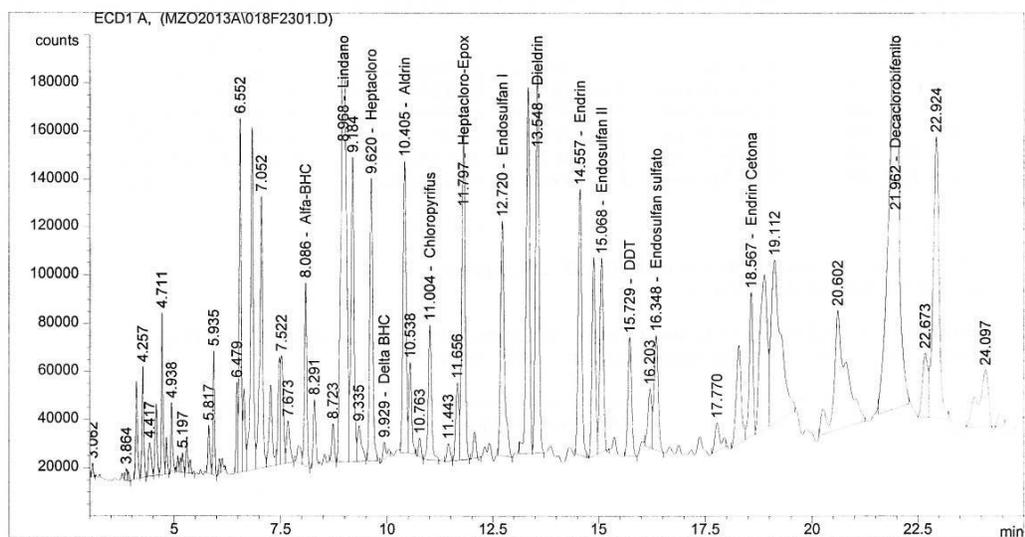
Results obtained with enhanced integrator!
 2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
 Warning : Calibrated compound(s) not found

 =====
 *** End of Report ***

5ml Florisil

```
=====
Injection Date   : 3/21/13 5:38:31 AM           Seq. Line :   23
Sample Name     : Mta-10                       Vial      :   18
Acq. Operator   : JRR                          Inj       :    1
                                                Inj Volume: 1 µl
Acq. Method    : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL.M
Last changed   : 3/20/13 4:02:54 PM by JRR
Analysis Method: D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL01A.M
Last changed   : 3/21/13 1:11:30 PM by JRR
                (modified after loading)
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608.
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      3/21/13 1:09:02 PM
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.819	VB	3.75957e4	1.84759e-5	6.94615e-1		Diclorvos
6.833	VV	6.39263e5	6.47021e-7	4.13616e-1		Tetra-m-Xileno
8.086	VP	2.83630e5	9.80542e-7	2.78111e-1		Alfa-BHC
8.968	VV	1.83651e6	1.20524e-6	2.21344		Lindano
9.065		-	-	-		Beta-BHC
9.620	BB	5.76734e5	1.10345e-6	6.36399e-1		Heptacloro
9.929	PB	4.03927e4	4.15725e-7	1.67922e-2		Delta BHC
10.405	BV	6.13298e5	5.33020e-7	3.26900e-1		Aldrin
11.004	VB	2.97447e5	2.91783e-6	8.67901e-1		Chloropyrifus
11.797	VB	7.51968e5	8.55207e-7	6.43088e-1		Heptacloro-Epox
12.720	BP	6.10935e5	1.09035e-6	6.66135e-1		Endosulfan I
13.328	BV	8.60349e5	5.94368e-7	5.11364e-1		DDE
13.548	VP	8.96534e5	6.53551e-7	5.85931e-1		Dieldrin
14.557	PB	6.54938e5	9.51072e-7	6.22894e-1		Endrin
14.882	PV	4.60126e5	1.00484e-6	4.62352e-1		DDD
15.068	VB	4.75880e5	1.38620e-6	6.59667e-1		Endosulfan II
15.729	BP	2.91249e5	1.30281e-6	3.79442e-1		DDT
16.038		-	-	-		Endrin aldehido
16.348	VP	3.15374e5	9.61807e-7	3.03329e-1		Endosulfan sulfato
18.279	PV	3.27662e5	3.16131e-6	1.03584		Metoxicloro
18.567	VV	3.66094e5	1.69616e-6	6.20955e-1		Endrin Cetona
21.962	BB	3.82054e6	7.78172e-7	2.97304		Decaclorobifenilo

```
Totals :                               14.91181
```

```

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

```

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

```

```

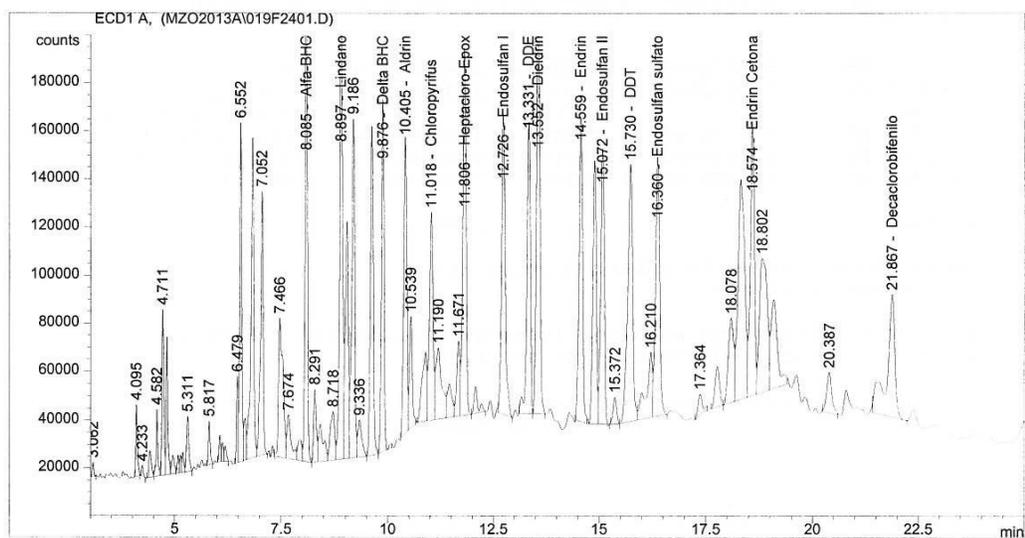
=====
*** End of Report ***

```

9ml C18

```
=====
Injection Date   : 3/21/13 6:15:27 AM           Seq. Line : 24
Sample Name     : Mta-11                       Vial      : 19
Acq. Operator   : JRR                          Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 1 µl

Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL.M
Last changed    : 3/20/13 4:02:54 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL01A.M
Last changed    : 3/21/13 1:11:30 PM by JRR
                 (modified after loading)
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608.
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      3/21/13 1:09:02 PM
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.818	VB	1.53916e5	1.86014e-5	2.86306		Diclorvos
6.831	VV	6.23961e5	6.45763e-7	4.02931e-1		Tetra-m-Xileno
8.085	VP	7.56015e5	1.08041e-6	8.16808e-1		Alfa-BHC
8.897	VV	8.83627e5	1.19469e-6	1.05566		Lindano
9.037	VV	4.84356e5	1.97177e-6	9.55039e-1		Beta-BHC
9.620	VP	6.52029e5	1.10826e-6	7.22615e-1		Heptacloro
9.876	VB	6.10165e5	1.35539e-6	8.27012e-1		Delta BHC
10.405	BV	6.10302e5	5.32852e-7	3.25201e-1		Aldrin
11.018	VV	5.10205e5	2.98049e-6	1.52066		Chloropyrifus
11.806	VP	8.36799e5	8.58616e-7	7.18489e-1		Heptacloro-Epox
12.726	BP	7.45412e5	1.10018e-6	8.20084e-1		Endosulfan I
13.331	BP	6.87599e5	5.83006e-7	4.00875e-1		DDE
13.552	VB	9.53509e5	6.54794e-7	6.24352e-1		Dieldrin
14.559	PB	7.41592e5	9.54249e-7	7.07664e-1		Endrin
14.884	PV	6.23566e5	1.02667e-6	6.40197e-1		DDD
15.072	VP	6.80885e5	1.40996e-6	9.60018e-1		Endosulfan II
15.730	VV	8.54088e5	1.26084e-6	1.07686		DDT
16.038		-	-	-		Endrin aldehido
16.360	VP	7.24820e5	9.72240e-7	7.04699e-1		Endosulfan sulfato
18.303	VV	9.94866e5	3.18723e-6	3.17087		Metoxicloro
18.574	VV	7.53305e5	1.74699e-6	1.31602		Endrin Cetona
21.867	BP	6.77031e5	7.44387e-7	5.03973e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 21.13310

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

```

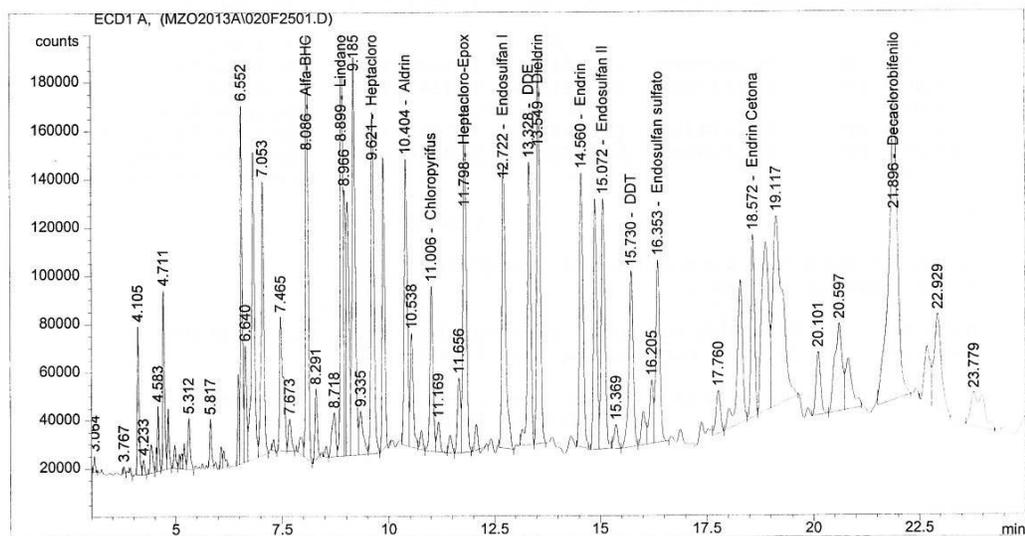
=====
*** End of Report ***
=====

```

5ml Florisil

```
=====
Injection Date   : 3/21/13 6:52:28 AM           Seq. Line : 25
Sample Name     : Mta-12                       Vial      : 20
Acq. Operator   : JRR                          Inj       : 1
                                                Inj Volume: 1 µl

Acq. Method    : D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL.M
Last changed   : 3/20/13 4:02:54 PM by JRR
Analysis Method: D:\HPCHEM\1\METHODS\PESTIC~1\PTCL01A.M
Last changed   : 3/21/13 1:11:30 PM by JRR
                (modified after loading)
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608.
```



=====
 External Standard Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 3/21/13 1:09:02 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.820	VB	6.53196e4	1.85464e-5	1.21144		Diclorvos
6.831	VV	6.31993e5	6.46431e-7	4.08540e-1		Tetra-m-Xileno
8.086	VB	8.09703e5	1.08439e-6	8.78032e-1		Alfa-BHC ✓
8.899	VV	8.46851e5	1.19381e-6	1.01098		Lindano
9.034	VV	4.52352e5	1.96588e-6	8.89269e-1		Beta-BHC
9.621	BP	6.94718e5	1.11052e-6	7.71495e-1		Heptacloro ✓
9.878	VB	4.93479e5	1.33964e-6	6.61084e-1		Delta BHC
10.404	BV	5.97260e5	5.32103e-7	3.17804e-1		Aldrin ✓
11.006	VV	3.48975e5	2.94002e-6	1.02599		Chloropyrifus
11.798	VB	7.88686e5	8.56772e-7	6.75724e-1		Heptacloro-Epox
12.722	BP	7.25778e5	1.09897e-6	7.97608e-1		Endosulfan I ✓
13.328	BP	6.65345e5	5.81114e-7	3.86641e-1		DDE
13.549	VB	9.00649e5	6.53646e-7	5.88706e-1		Dieldrin
14.560	PB	6.75525e5	9.51901e-7	6.43033e-1		Endrin ✓
14.883	PV	5.84457e5	1.02256e-6	5.97641e-1		DDD
15.072	VB	6.48246e5	1.40718e-6	9.12198e-1		Endosulfan II
15.730	VV	5.10763e5	1.27543e-6	6.51444e-1		DDT ✓
16.007	VV	9.73865e4	1.36655e-6	1.33084e-1		Endrin aldehido
16.353	VP	4.89724e5	9.68382e-7	4.74240e-1		Endosulfan sulfato ✓
18.277	VV	5.36920e5	3.17637e-6	1.70546		Metoxicloro
18.572	VV	4.47682e5	1.71419e-6	7.67410e-1		Endrin Cetona
21.896	BB	1.84568e6	7.70387e-7	1.42189		Decaclorobifenilo

Totals : 16.92971

Results obtained with enhanced integrator!
 1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

 =====
 *** End of Report ***
 =====

Anexo VII.

Reportes de análisis de plaguicidas.

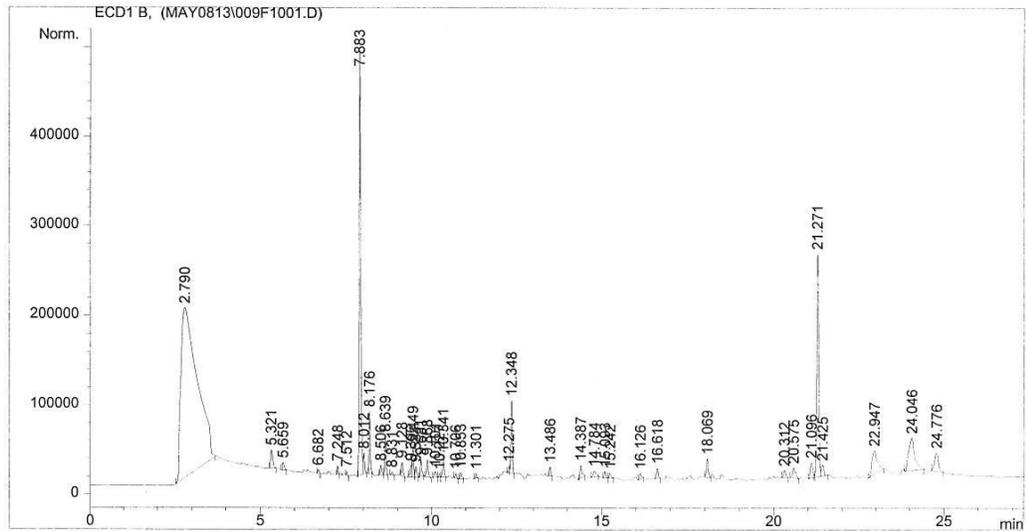
Data File D:\HPCHEM\2\DATA\MAY0813\009F1001.D

Sample Name: Mta-01

AGD's Americano, Generico01, 1.0120g

```
=====
Injection Date   : 5/8/13 3:12:36 PM           Seq. Line : 10
Sample Name      : Mta-01                       Vial       : 9
Acq. Operator    : JRR                          Inj        : 1
                                           Inj Volume : 1 µl

Acq. Method      : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed     : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method  : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed     : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.883	PV	1.43392e6	2.53954e-7	3.64151e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.449	VV	9.30224e4	5.46801e-7	5.08648e-2		alfa-BHC
10.227	VP	8774.70215	3.14384e-6	2.75863e-2		Lindano
10.706	BP	1.51949e4	3.68679e-6	5.60206e-2		Heptacloro
11.301	PB	1.41919e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.846		-	-	-		Clorpirifos
12.275	PV	1.84088e4	2.76015e-5	5.08110e-1		Metil Paration
12.348	VP	2.16542e5	7.37013e-6	1.59595		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.486	PP	2.65453e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.387	PB	5.91935e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.784	PB	4.35274e4	1.66353e-6	7.24092e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.126	PB	2.36980e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.069	BB	7.44150e4	9.06757e-7	6.74763e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.271	VV	9.74800e5	4.12102e-7	4.01717e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 3.14428

Results obtained with enhanced integrator!

6 Warnings or Errors :

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

```

```

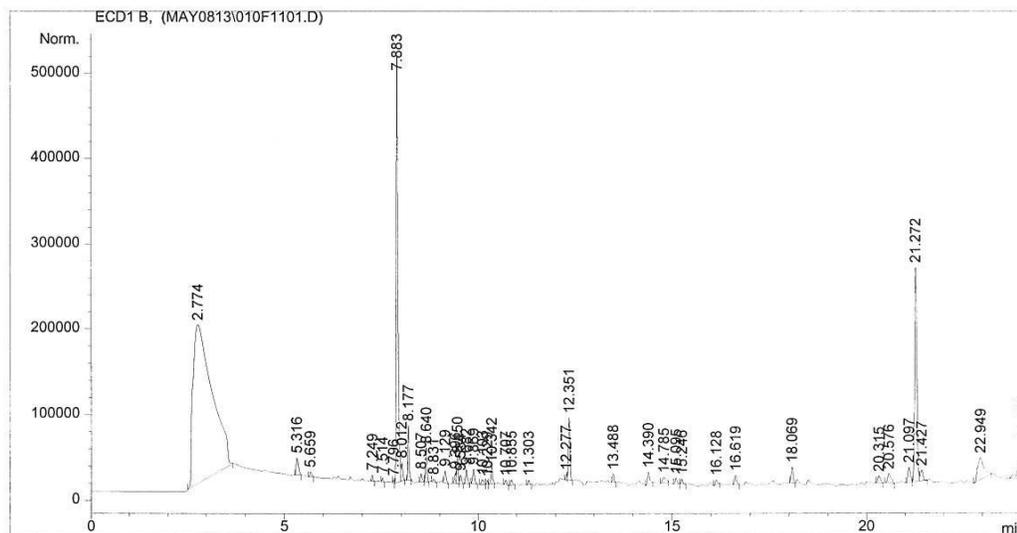
=====
*** End of Report ***
=====

```

AGD's Americano, Generico02. 0.9950g

```

=====
Injection Date   : 08-May-13, 15:45:36           Seq. Line :   11
Sample Name     : Mta-02                         Vial      :   10
Acq. Operator   : JRR                           Inj       :    1
Acq. Method     : PT1701.M
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed    : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
=====
    
```



External Standard Report

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
    
```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.883	VV	1.49927e6	2.55225e-7	3.82651e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.450	VV	8.06840e4	5.77903e-7	4.66275e-2		alfa-BHC
10.229	VP	9156.84766	3.02967e-6	2.77422e-2		Lindano
10.707	BP	1.58343e4	3.59264e-6	5.68869e-2		Heptacloro
11.303	PB	1.35751e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.846		-	-	-		Clorpirifos
12.277	PV	1.58370e4	2.76045e-5	4.37171e-1		Metil Paration
12.351	VP	1.96813e5	7.35570e-6	1.44770		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.488	PP	2.58771e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.390	PB	5.63122e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.785	PB	4.43147e4	1.66146e-6	7.36273e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.128	PB	2.14139e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.069	BB	6.59261e4	9.49711e-7	6.26107e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.272	VV	9.90223e5	4.12366e-7	4.08334e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 2.94335

Results obtained with enhanced integrator!
6 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

=====
*** End of Report ***

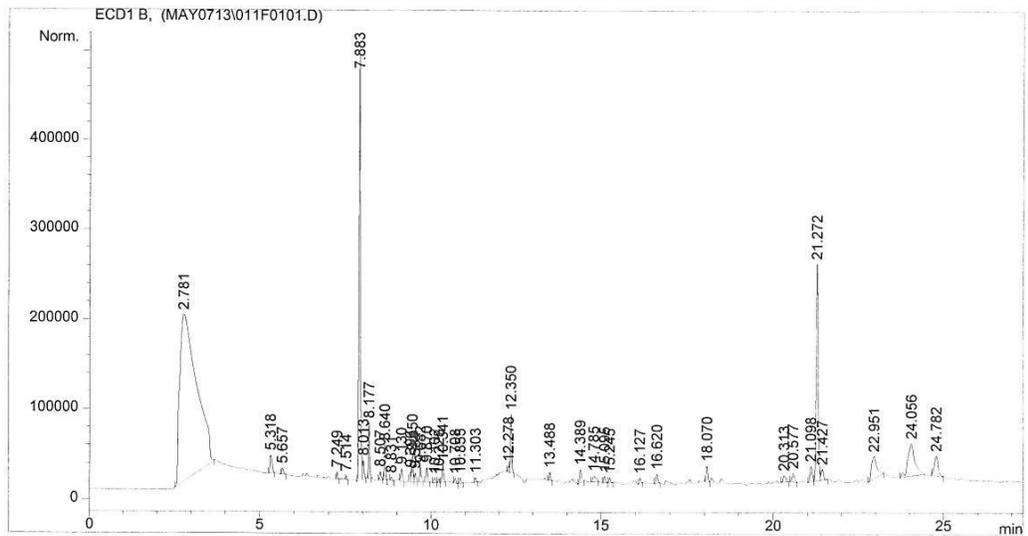
Data File D:\HPCHEM\2\DATA\MAY0713\011F0101.D

Sample Name: Mta-03

AGD's Americano, Generico03. 1.0090g

```
=====
Injection Date   : 5/8/13 4:16:16 PM           Seq. Line :    1
Sample Name     : Mta-03                       Vial      :   11
Acq. Operator   : JRR                          Inj       :    1
                                           Inj Volume: 1 µl

Acq. Method    : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed   : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed   : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.883	PV	1.42446e6	2.53761e-7	3.61472e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.450	VV	7.71876e4	5.88524e-7	4.54268e-2		alfa-BHC
10.228	VP	9719.72266	2.87785e-6	2.79719e-2		Lindano
10.708	BP	1.48489e4	3.74114e-6	5.55517e-2		Heptacloro
11.303	PB	1.37372e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.846		-	-	-		Clorpirifos
12.278	BV	1.69085e4	2.76031e-5	4.66728e-1		Metil Paration
12.350	VB	1.75784e5	7.33675e-6	1.28968		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.488	PP	2.46760e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.389	PB	5.79119e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.785	PB	4.65926e4	1.65587e-6	7.71511e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.127	PB	1.88333e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.070	BB	5.89155e4	9.94517e-7	5.85925e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.272	VV	9.30846e5	4.11302e-7	3.82859e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 2.76543

Results obtained with enhanced integrator!

6 Warnings or Errors :

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

```

```

=====
*** End of Report ***

```

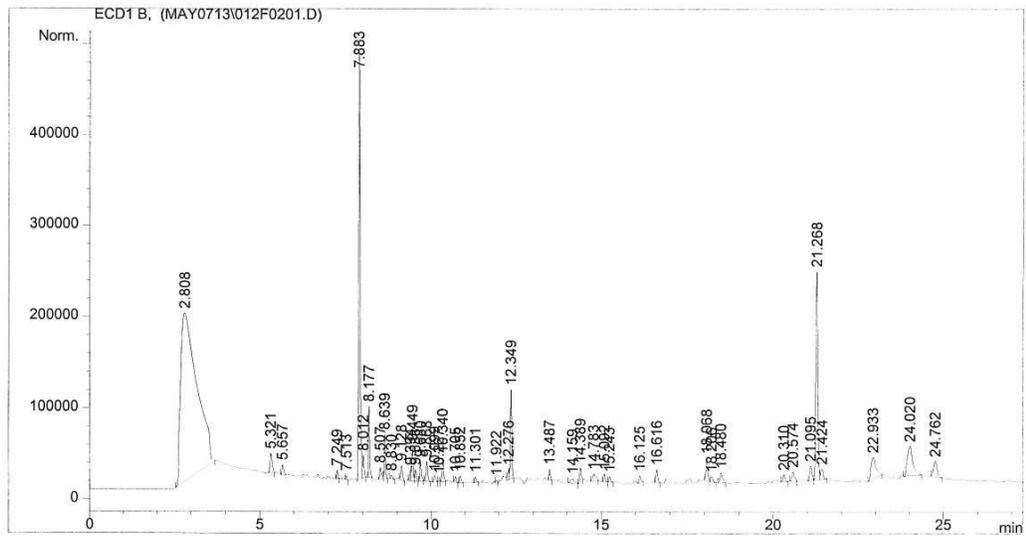
Data File D:\HPCHEM\2\DATA\MAY0713\012F0201.D

Sample Name: Mta-04

AGD's Americano, Generico04. 1.0115g

```
=====
Injection Date   : 5/8/13 4:49:21 PM           Seq. Line :    2
Sample Name     : Mta-04                       Vial      :   12
Acq. Operator   : JRR                          Inj       :    1
                                                Inj Volume: 1 µl

Acq. Method     : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed    : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed    : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.883	PV	1.39598e6	2.53162e-7	3.53408e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.449	VV	9.91876e4	5.34160e-7	5.29820e-2		alfa-BHC
10.227	VP	9752.69238	2.86950e-6	2.79854e-2		Lindano
10.705	BP	1.89152e4	3.22817e-6	6.10614e-2		Heptacloro
11.301	PB	1.75787e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.922	BP	8461.48340	0.00000	0.00000		Clorpirifos
12.276	BV	3.44149e4	2.75928e-5	9.49605e-1		Metil Paration
12.349	VB	2.64831e5	7.39638e-6	1.95879		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.487	PP	3.25957e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.389	VB	5.92220e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.783	PB	5.00588e4	1.64833e-6	8.25135e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.125	PB	2.82371e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.068	BB	8.76109e4	8.56513e-7	7.50398e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.268	VV	9.11530e5	4.10926e-7	3.74571e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 3.93596

Results obtained with enhanced integrator!

7 Warnings or Errors :

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Clorpirifos)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

```

```

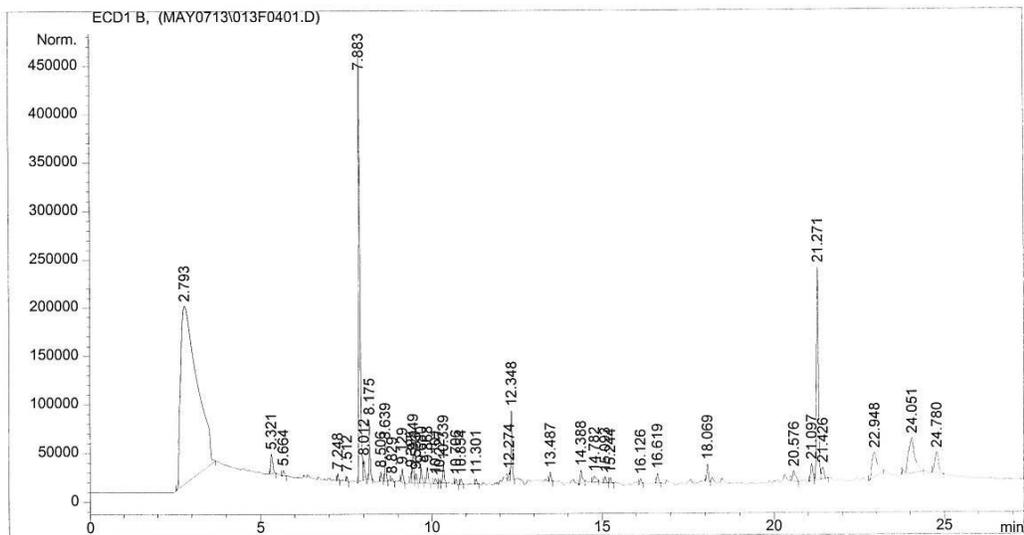
=====
*** End of Report ***
=====

```

AGD's Americano, Generico05. 1.0115g

```
=====
Injection Date : 5/8/13 5:55:29 PM           Seq. Line : 4
Sample Name    : Mta-05                       Vial       : 13
Acq. Operator  : JRR                          Inj        : 1
                                                Inj Volume : 1 µl

Acq. Method   : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed  : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed  : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
```



=====
 External Standard Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.883	PV	1.32762e6	2.51620e-7	3.34054e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.449	VV	7.74177e4	5.87796e-7	4.55058e-2		alfa-BHC
10.227	VP	8061.85352	3.38575e-6	2.72954e-2		Lindano
10.706	BP	1.55822e4	3.62883e-6	5.65454e-2		Heptacloro
11.301	PB	1.37704e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.846		-	-	-		Clorpirifos
12.274	BV	2.34382e4	2.75975e-5	6.46835e-1		Metil Paration
12.348	VB	1.91547e5	7.35134e-6	1.40813		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.487	PP	2.49518e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.388	PB	5.53734e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.782	PB	4.09482e4	1.67087e-6	6.84191e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.126	PB	1.78726e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.069	BB	6.22048e4	9.72237e-7	6.04778e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.271	VV	8.58287e5	4.09802e-7	3.51727e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 2.99899

Results obtained with enhanced integrator!

6 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
 Warning : Calibrated compound(s) not found
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

 =====
 *** End of Report ***
 =====

=====
 External Standard Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.883	PV	1.41612e6	2.53588e-7	3.59111e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.450	VV	7.55291e4	5.93907e-7	4.48572e-2		alfa-BHC
10.229	VP	8338.27246	3.28704e-6	2.74082e-2		Lindano
10.708	BP	1.52422e4	3.67956e-6	5.60847e-2		Heptacloro
11.303	PB	1.36882e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.846		-	-	-		Clorpirifos
12.276	PV	1.52672e4	2.76053e-5	4.21455e-1		Metil Paration
12.350	VP	1.87778e5	7.34808e-6	1.37981		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.488	PP	2.48711e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.389	PB	5.58715e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.784	PB	4.93927e4	1.64970e-6	8.14829e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.127	PB	2.00374e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.069	BB	6.15540e4	9.76456e-7	6.01048e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.270	VV	9.26160e5	4.11212e-7	3.80848e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 2.81116

Results obtained with enhanced integrator!
 6 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
 Warning : Calibrated compound(s) not found
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

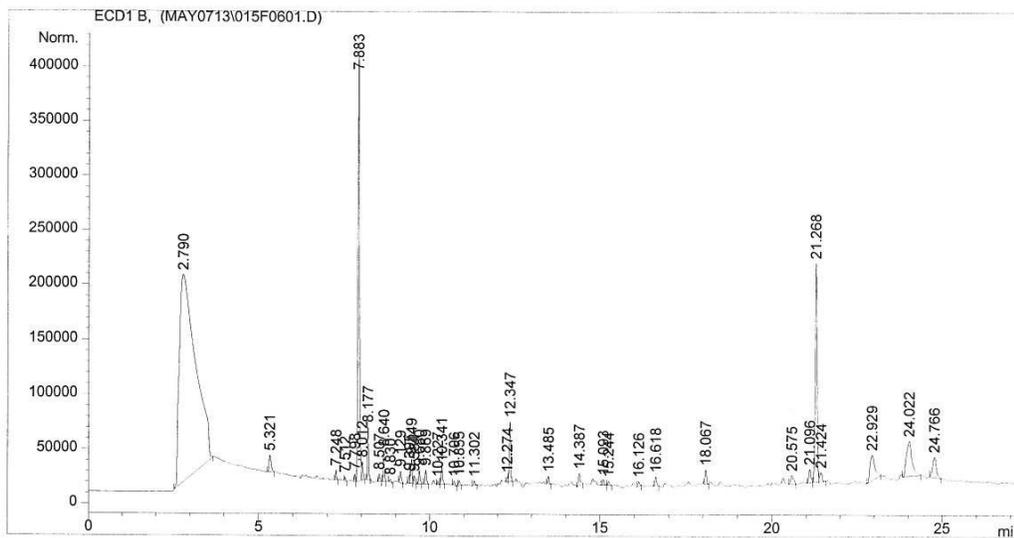
 =====
 *** End of Report ***
 =====

AGD's Americano, Premium02. 0.9980g

```

=====
Injection Date : 5/8/13 7:01:35 PM           Seq. Line :    6
Sample Name    : Mta-07                       Vial       :   15
Acq. Operator  : JRR                          Inj        :    1
                                           Inj Volume : 1 µl

Acq. Method   : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed  : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed  : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
    
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.883	VV	1.20611e6	2.48447e-7	2.99654e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.449	VV	5.94899e4	6.61441e-7	3.93490e-2		alfa-BHC
10.227	PB	7990.50488	3.41234e-6	2.72663e-2		Lindano
10.706	BP	1.17316e4	4.37520e-6	5.13279e-2		Heptacloro
11.302	PB	1.14305e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.846		-	-	-		Clorpirifos
12.274	PV	1.12776e4	2.76132e-5	3.11411e-1		Metil Paration
12.347	VB	1.50859e5	7.30745e-6	1.10239		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.485	PP	1.78490e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.387	PB	4.42926e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
15.093	PB	1.80611e4	1.82780e-6	3.30122e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.126	PB	1.23352e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.067	BP	4.27346e4	1.15405e-6	4.93181e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.268	VV	7.71907e5	4.07648e-7	3.14666e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 2.22840

Results obtained with enhanced integrator!
6 Warnings or Errors :

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

```

```

=====
*** End of Report ***
=====

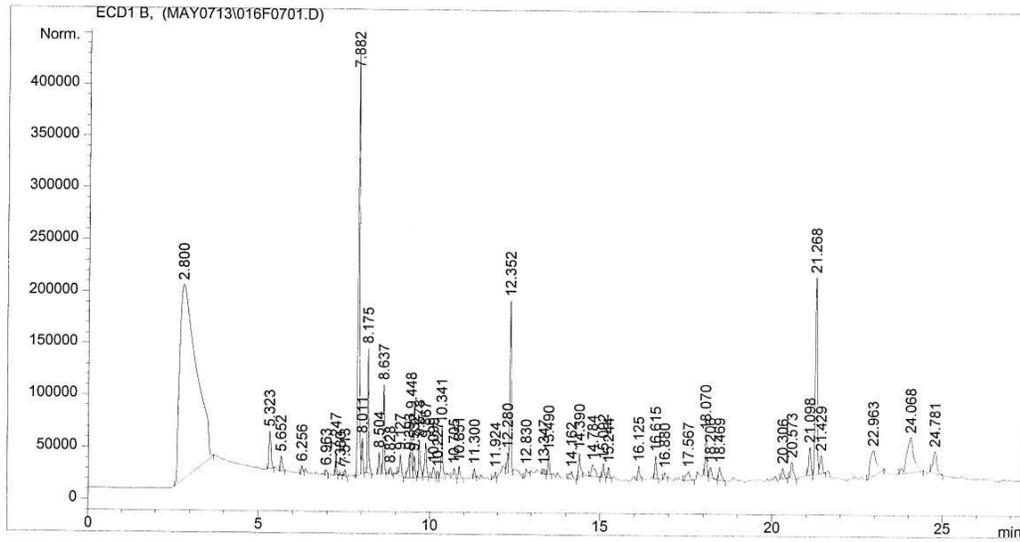
```

AGD's Americano, Premium03. 1.0215g

```

=====
Injection Date : 5/8/13 7:34:42 PM           Seq. Line : 7
Sample Name    : Mta-08                       Vial       : 16
Acq. Operator  : JRR                          Inj        : 1
                                                Inj Volume : 1 µl

Acq. Method   : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed  : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed  : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
    
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.882	PV	1.20289e6	2.48355e-7	2.98744e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.448	VV	1.62356e5	4.59948e-7	7.46752e-2		alfa-BHC
10.227	VV	1.67266e4	1.84324e-6	3.08311e-2		Lindano
10.705	BP	4.16844e4	2.20496e-6	9.19126e-2		Heptacloro
11.300	PB	2.61197e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.924	PP	2.44408e4	0.00000	0.00000		Clorpirifos
12.280	BV	5.96971e4	2.75886e-5	1.64696		Metil Paration
12.352	VP	4.35165e5	7.44246e-6	3.23870		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.830	PB	2.47916e4	0.00000	0.00000		Heptacloro Epox.
13.490	BP	5.39829e4	1.78969e-8	9.66128e-4		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.390	PB	8.96212e4	1.12149e-8	1.00509e-3		Dieldrin
14.784	PP	8.63820e4	1.60573e-6	1.38706e-1		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.125	PB	4.45377e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.070	BV	1.35076e5	7.56947e-7	1.02246e-1		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.268	VV	7.31529e5	4.06467e-7	2.97343e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 5.92209

Results obtained with enhanced integrator!
6 Warnings or Errors :

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Clorpirifos)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Heptacloro E
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

```

```

=====
*** End of Report ***

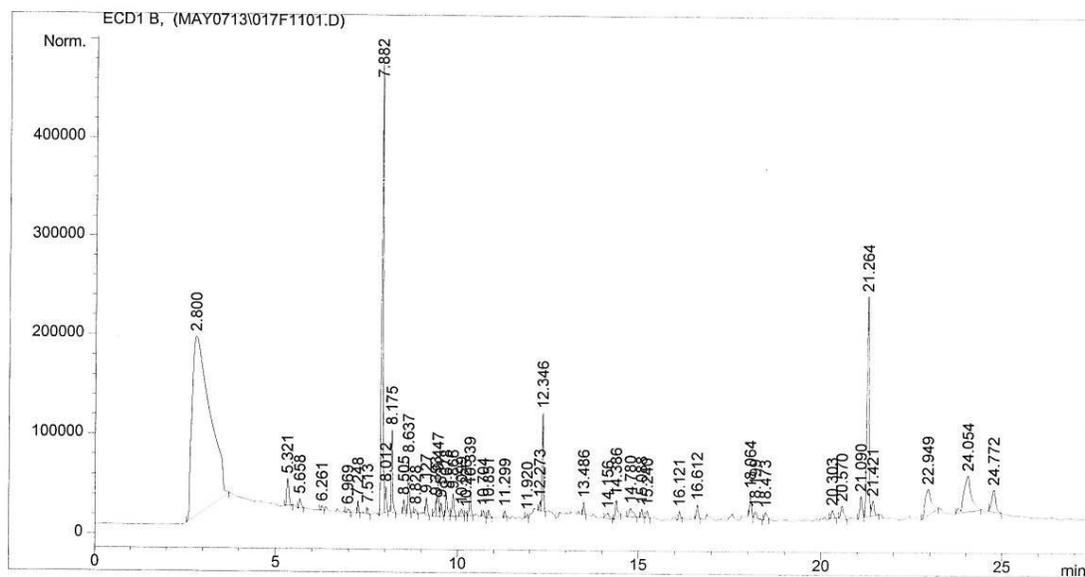
```

AGD's Americano, Premium04. 1.0020g

```

=====
Injection Date   : 5/8/13 9:47:10 PM           Seq. Line :   11
Sample Name     : Mta-09                       Vial      :   17
Acq. Operator   : JRR                          Inj       :    1
                                           Inj Volume: 1 µl

Acq. Method     : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed    : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed    : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
    
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier          :      1.0000
Dilution           :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.882	PV	1.36516e6	2.52486e-7	3.44683e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.447	VV	1.08212e5	5.18253e-7	5.60811e-2		alfa-BHC
10.226	VP	1.03219e4	2.73377e-6	2.82176e-2		Lindano
10.704	BP	1.93353e4	3.18746e-6	6.16307e-2		Heptacloro
11.299	PB	1.84669e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.920	BP	9210.97852	0.00000	0.00000		Clorpirifos
12.273	PV	2.25047e4	2.75981e-5	6.21086e-1		Metil Paration
12.346	VP	2.59739e5	7.39407e-6	1.92053		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.486	PB	3.39391e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.386	PB	7.45241e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.780	PB	6.32010e4	1.62727e-6	1.02845e-1		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.121	PB	2.59468e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.064	BV	8.23069e4	8.74771e-7	7.19998e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.264	VV	8.75920e5	4.10189e-7	3.59293e-1		Decaclorobifenilo

```
Totals :                               3.56636
```

Results obtained with enhanced integrator!

7 Warnings or Errors :

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Clorpirifos)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

```

```

=====
*** End of Report ***

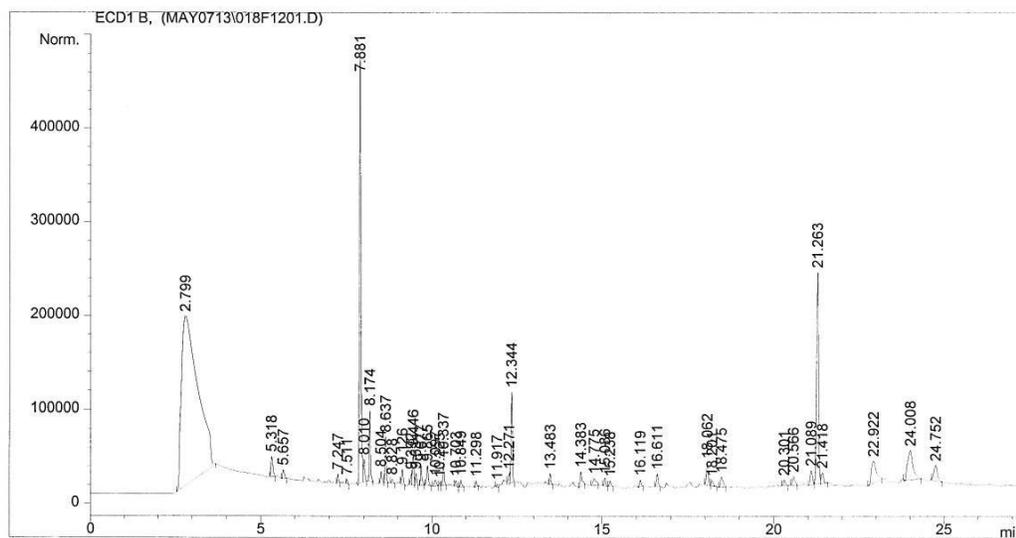
```

AGD's Americano, Premium05. 1.0110g

```

=====
Injection Date   : 5/8/13 10:20:16 PM           Seq. Line :   12
Sample Name     : Mta-10                       Vial       :   18
Acq. Operator   : JRR                          Inj        :    1
                                                Inj Volume : 1 µl

Acq. Method     : D:\HPCHEM\2\METHODS\PT1701.M
Last changed    : 7/14/12 3:39:52 PM by JRR
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\PTCLPROM.M
Last changed    : 5/9/13 4:53:42 PM by JRR
METODO PARA PESTICIDAS. METODO EPA 8081 y 505, COLUMNA SPB-608,
    
```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      Thursday, May 09, 2013 4:29:57 PM
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000

```

Signal 1: ECD1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
6.103		-	-	-		Diclorvos
7.881	PV	1.36004e6	2.52370e-7	3.43233e-1		Tetracloro-m-Xileno
9.446	VV	9.76078e4	5.37247e-7	5.24395e-2		alfa-BHC
10.225	VP	9263.32324	2.99954e-6	2.77857e-2		Lindano
10.703	BP	1.88132e4	3.23832e-6	6.09232e-2		Heptacloro
11.298	PB	1.74657e4	0.00000	0.00000		Aldrin
11.917	BP	8176.01514	0.00000	0.00000		Clorpirifos
12.271	BV	3.38562e4	2.75930e-5	9.34193e-1		Metil Paration
12.344	VB	2.62338e5	7.39526e-6	1.94006		Malation
12.437		-	-	-		Delta-BHC
12.825		-	-	-		Heptacloro Epox.
13.483	PB	3.19830e4	0.00000	0.00000		Endosulfan I
13.934		-	-	-		DDE
14.383	PB	6.37603e4	0.00000	0.00000		Dieldrin
14.775	PB	4.77929e4	1.65313e-6	7.90080e-2		Endrin
15.953		-	-	-		Endosulfan II
16.119	PB	2.38878e4	0.00000	0.00000		DDT
17.214		-	-	-		Endrin Aldehido
18.062	BB	8.53490e4	8.64022e-7	7.37434e-2		Endosulfan Sulfato
19.101		-	-	-		Endrin Cetona
21.263	VV	8.80316e5	4.10283e-7	3.61179e-1		Decaclorobifenilo

Totals : 3.87256

Results obtained with enhanced integrator!

7 Warnings or Errors :

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Aldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Clorpirifos)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Endosulfan I)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Dieldrin)
Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (DDT)

```

```

=====
*** End of Report ***

```