

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
MAURICIO ÁLVAREZ GÓMEZ
luisprieto@odinpetroleumcorp.com
mauricioalvarez@grupodin.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149589- -00005-0000

Fecha: 2012-10-17 16:05:39 Dep. 2020 DIR.NUEVAS
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 519 TRASLADOINFORME Folios: 9

ASUNTO Radicación 09 149589
 Trámite 002
 Evento 001
 Actuación 519
 Oficio 9 - 18 5 6 4
 Folios 9

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☒		
Vía PCT (Fase Nacional)	☐	Capítulo I	☒
		Capítulo II	☐
No. Solicitud Internacional			
Fecha de Presentación Internacional			

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 13 a 18	31/Diciembre/2009
Reivindicaciones:	Folios 19 a 20	31/Diciembre/2009
Oposiciones:	Folios 26 a 33	Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia 21/Junio/2010
Respuesta del solicitante:	Folios 40 a 101	02/Noviembre/2010
Prioridad:	No presenta	

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Método de Determinación de Fame's en Biodiesel por Cromatografía de Gas".

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de proporcionar métodos de ensayo útiles para la determinación del contenido de metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía de gas con cadenas de C₈ a C_{24:1} en una muestra.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un método que se caracteriza por cuantificar el contenido de metil ésteres de ácidos grasos en porcentaje másico utilizando un cromatografo de gas con detector FID.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C 7 B 1/0.

3. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El objeto de las reivindicación 1 hace referencia a un uso "*cuantificar el contenido de metil ésteres de ácidos grasos en porcentaje másico, utilizando un cromatógrafo de gas con detector FID*"; no son características técnicas que defina a la invención, lo cual no es permitido de acuerdo al art. 14. Por lo tanto, las mencionadas reivindicaciones no son patentables.

4. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Durante la evaluación de claridad y concisión de las reivindicaciones, esta Oficina encontró que:

- La reivindicación 1 se refiere a un método, sin embargo no dice a que hace referencia y no muestra la secuencia de etapas técnicas por medio de las cuales se transforme una materia en un producto o se obtenga un resultado. Es así como los "pasos" se limitan a suministrar una serie de elementos (equipos) pero no se reivindican las etapas técnicas con sus condiciones técnicas (temperaturas, concentraciones, presiones, etc). Por lo anterior se debe escribir la reivindicación 1 de manera tal que sea clara la invención, diferenciándose el preámbulo de la parte caracterizante (características que la invención añade al estado de la técnica) de acuerdo al objeto de la invención del método que se encuentra conformado por "una serie o sucesión de operaciones que inciden sobre una materia (solida, liquida o gaseosa) encaminada a la obtención de una cosa o un resultado.
- Las reivindicaciones 1, 9 y 10, no son claras porque presentan resultados a obtener "*determinación del contenido de metil ésteres con cadenas carbonadas desde C8 a C24:1, en Biodiesel B100*", "*relación Split 80:1*", "*rango de determinación de contenido de FAME's en porcentaje másico de 90 a 100%*", lo cual no es permitido, puesto que las citadas reivindicaciones incluirían no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.
- Las reivindicaciones 2 a 4, no tienen suficiente antecedente en las reclamaciones precedentes, porque los términos "*solución de estándar interno*" y "*muestra de biodiesel*" no están contenidos en la reivindicación 1, se sugiere incluirlos o modificarlos de acuerdo con el objeto que se busca proteger.
- Se le sugiere al solicitante escribir las reivindicaciones de tal forma que especifique de que método se trata el objeto a proteger dejando en claro lo que es conocido en el estado de la técnica y las características que hacen

que su invención sea nueva e inventiva precedidas de la frase “caracterizado por”, de tal forma que quede claro el aporte de su invención al estado de la técnica.

El capítulo reivindicatorio se debe modificar ya que no son claras las etapas técnicas del método, dado que las reivindicaciones son las características técnicas esenciales de una invención, para las cuales se reclama la protección legal mediante la solicitud de patente. En el caso de una patente concedida, las reivindicaciones aprobadas determinan el alcance de la protección legal otorgada. Por lo tanto, la definición de las reivindicaciones debe realizarse teniendo en cuenta las siguientes indicaciones:

- a) Las reivindicaciones deben definir el objeto cuya protección se solicita; ser claras y concisas y sustentarse enteramente en la descripción.
- b) La esencia o razón de ser de una reivindicación consiste en definir la invención, indicando sus características técnicas, dándole el alcance de la protección. Las reivindicaciones deberán delimitar claramente la invención respecto al estado de la técnica o tecnología anterior, de modo que se observe en forma concisa lo nuevo que se está aportando a la tecnología y todo aquello que lo hace diferente de lo ya existente.
- c) En la redacción de las reivindicaciones, se aconseja iniciar con la reivindicación menos limitativa, es decir más amplia, que contenga el menor número de características técnicas posibles pero si suficientes para cumplir con el requisito de novedad, e incluir, una a una, dichas características limitativas en las reivindicaciones posteriores, que en cualquier caso serán dependientes de la primera. El grado de importancia de las características técnicas de la invención a los efectos de redacción de las reivindicaciones deberá determinarse en función del estado técnica más próxima a la invención. De esta forma podrá determinarse que características deberán incluirse necesariamente en la reivindicación principal y cuales podrán formar parte de las reivindicaciones dependientes.
- d) Cada reivindicación consta de un preámbulo y una parte caracterizadora. El preámbulo normalmente coincide con el título de la invención y sirve de introducción informativa sobre el objeto que va a ser protegido. Contiene la información técnica conocida en el estado de la técnica del objeto que se pretende proteger. La parte caracterizadora, que suele seguir al preámbulo precedida por la frase “caracterizado por”, recoge las características técnicas que van a ser protegidas y que constituyen la novedad frente al objeto conocido del estado de la técnica.
- e) Las reivindicaciones pueden ser independiente o dependientes. Las reivindicaciones independientes deben contener todas las características esenciales que definen la invención, mientras que las reivindicaciones dependientes son definiciones particulares de la invención. En su redacción, las reivindicaciones dependientes hacen referencia en el preámbulo de la reivindicación principal de la cual dependen y definen en su parte caracterizadora, las características técnicas particulares que se desean proteger.
- f) En la redacción y estructura de las reivindicaciones se debe:
 - Evitar inconsistencias entre la descripción y las reivindicaciones.
 - Evitar en la medida de lo posible caracteres funcionales, es decir, la definición de un producto por la funcionalidad del mismo.

- Evitar incluir en las reivindicaciones referencia a los dibujos o figuras de la descripción técnica.
- Exponer las "características técnicas de la invención ". Esto significa que no deben contener declaraciones refiriéndose, por ejemplo, a las ventajas comerciales, resultados a obtener, usos u otras consideraciones no técnicas.

En caso que una solicitud incluya dibujos, las características técnicas mencionadas en las reivindicaciones podrán ir seguidas de signos de referencia, relativos a las partes correspondientes de esas características en los dibujos, si facilitan la comprensión de las reivindicaciones. Los signos de referencia se colocaran entre paréntesis.

- g) Una forma de presentar una reivindicación es hacerlo en dos partes: preámbulo (puede ser el título de la solicitud) y parte caracterizante. En este caso la estructura es la siguiente:

El preámbulo indicara primero cual es la materia de la invención (aparato, proceso, composición, etc.) y seguidamente las características técnicas necesarias o elementos necesarios para definir la invención pero que combinadas forman parte del estado de la técnica. Esto último solo se aplica a las reivindicaciones independientes.

La parte caracterizante define las características que en combinación con el preámbulo se desean proteger, es decir las características que la invención añade al estado de la técnica.

Ver ejemplos de redacción de las reivindicaciones para una solicitud de patente¹.

Por lo anterior, el capítulo reivindicatorio de la solicitud en estudio no cumple con el requisito de claridad de acuerdo con el artículo 30 de la Decisión 486. En consecuencia, el solicitante deberá presentar un nuevo capítulo reivindicatorio, donde se hayan modificado las objeciones.

Descripción (Art 28 D 486)

La descripción presenta varias deficiencias, ya que no incluye la siguiente información:

- Una descripción de la invención en términos que permitan la comprensión del problema técnico y de la solución aportada por la invención.
- Una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención, utilizando ejemplos y referencias a los dibujos, de ser pertinentes.
- La invención no muestra resultados concretos demostrables del efecto técnico inesperado de la invención, además no es claro como se obtiene el rango de aplicación propuesto por la invención, como mejora al método planteado según EN 14103 considerando la preparación de la muestra y la fórmula de cálculo del porcentaje másico contenido de metiléster propuesta.

Por lo anterior, la descripción no cumple con el requisito de claridad y/o divulgación completa lo que haría difícil su comprensión y ejecución de acuerdo al art. 28 de de la Decisión 486. La descripción tiene serios problemas de claridad y suficiencia pero

¹ http://www.sic.gov.co/archivo_descarga.php?idcategoria=1854

se le indica al solicitante que respecto a la información requerida, no se admitirá modificaciones que amplíen el objeto inicial de la invención, sin perjuicio de lo anterior se aceptaran: (i) documentos relevantes del estado de la técnica no citados siempre y cuando no incluya aclaraciones, o cometarios del solicitante, respecto a la invención; (ii) adaptación de la descripción a las reivindicaciones; (iii) otras de naturaleza similar.

5. Análisis de la Oposición

Argumentaciones de Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia

Dice el oponente que esta solicitud pretende obtener patente para el método de determinación de metil ésteres de ácidos grasos en % másico utilizando un cromatógrafo de gas con detector de ionización en llama FID, el cual ya es conocido en el estado de la técnica en la norma ISO 5508:1990 (Grasas y aceites animales y vegetales - Análisis por cromatografía de gases de metil ésteres de ácidos grasos); EN 14103 (Fatty acid Methyl Esters in B100 Biodiesel by Gas Chromatography) y en Colombia la NTC 5013 (Grasas y Aceites vegetales y animales. Análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía).

Respuestas del Solicitante

Argumenta el solicitante que las referencias citadas no se pueden considerar como iguales a la invención, así el solicitante menciona que la norma ISO 5508:1990 proporciona una guía general para la aplicación de la cromatografía de gas para determinar cuantitativa y cualitativamente la composición de una mezcla de metil ésteres de ácidos grasos, por tanto, se enmarca en el área de las grasas alimenticias, mientras que en el caso de la invención el campo es el de los métodos de análisis en el área de los biocombustibles, además se puede constar muchas diferencias en todas las secciones de la norma, como, el rango de tamaño de cadena de metil ésteres a determinar el cual no está especificado, la forma general, en la repetibilidad el valor de la desviación estándar no debe ser mayor de 1%.

Respecto a la norma EN 14103, el solicitante refiere que es una norma europea donde se establece una metodología de determinación de metil ésteres por cromatografía de gas en un rango de C₁₄ a C₂₄, mientras que el método de la invención refiere un rango de aplicación de C₈ a C₂₄, incluyendo cadenas de C₈, C₁₀ y C₁₂ que no eran cuantificables en dicha norma europea y además se ha empleado como antecedente a la invención y cita la referencia ISO 5508:1009.

En relación a la referencia NTC 5013, el solicitante menciona que es una guía general de aplicación de la cromatografía de gas para determinar ésteres de ácidos grasos bajo las indicaciones de la ISO 5508:1990 a la cual incluyen en las referencias bibliográficas.

Respecto a las casas fabricantes de equipos de cromatografía afirma que estas suelen elaborar notas de aplicación donde se ajustan las condiciones operacionales del equipo que están ofreciendo, para que cumpla con una norma referida y en el anexo 5 se presenta una nota de aplicación de la casa "Agilent Technologies" de la norma europea EN 14103, un equipo de esta marca fue el empleado en el desarrollo de la invención "Método de determinación de FAMES en Biodiesel por Cromatografía de Gas".

La invención propone un “*Método de Determinación de Fames en Biodiesel por cromatografía de Gas*”, el cual se diferencia en el área de aplicación, el rango de tamaño de cadena carbonada, la preparación e inyección de muestras y estándar interno y formula, de una forma que se traduce en un método con una desviación estándar satisfactoria.

Respuesta del Examinador Técnico

Los documentos presentados en la Oposición si desvirtúan la Novedad del objeto de esta solicitud; por lo cual si se considerarán dentro del Examen de Patentabilidad, ya que la reivindicación independiente 1 está escrita de manera muy general, lo cual hace difícil establecer claramente el objeto que se busca proteger, viéndose por tanto, afectada por dichos documentos.

Cabe mencionar, respecto al capítulo reivindicatorio propuesto que un método conocido en el estado de la técnica no puede ser objeto de nueva patente, por el simple hecho de atribuírsele una aplicación distinta (métodos de análisis en el área de biocombustibles) al originalmente comprendido el estado de la técnica inicial (métodos de análisis en el área de alimentos), de acuerdo con el Art 21, por tanto no es un argumento válido que el método propuesto por la invención no se pueda considerar como igual al conocido en el estado de técnica, según refiere el solicitante.

6. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Nacional: diciembre 31 de 2009 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Item	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Artículo 1	Determining the Ester and Linoleic Acid Methyl Ester Content to Comply with EN14103	7/Diciembre/2006
D2	Artículo 2 ²	Validación de un Método por Cromatografía de Gases para la Determinación de los Ácidos Grasos que Comprenden el D-004 ingrediente activo	2009
D3	Artículo 3	EN 14103 (Fatty Acid Methyl Esters in B100 Biodiesel by Gas Chromatography)	2008
D4	Artículo 4	NTC 5013 (Grasas y Aceites vegetales y animales. Análisis de los esteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía)	18/diciembre/2001

1 Determining the Ester and Linoleic Acid Methyl Ester Content to Comply with EN14103. Agilent Technologies Ind. Cgun-Xiao Wang and James McCurry. USA. Diciembre 7 de 2006, divulga (Fl. 80 a 83, resumen) un método por cromatografía de gases con un split/splitless de entrada y detector de ionización en llama FID para determinar el contenido de éster y éster metílico del ácido linoleico contenido en ácidos grasos de ésteres metílicos (FAME) para uso en biocomburantes puros o como componentes de mezcla y combustibles diesel. El método es adecuado para que determinar el contenido de ésteres metílicos FAME de entre C₁₄ y C₂₄. Esta

2 <http://revista.cnrc.edu.cu/revista/files/CQ-2009-1-017-022.pdf>
Expediente 09 149 589 1er Art 45

aplicación utiliza el sistema Agilent 6850 y la columna HP-INNOWax; la calibración se realiza con estándares internos de heptadecanoato metilo. Después de analizar varios tipos de biodiesel, se obtuvo una excelente precisión, superando las especificaciones del método EN14103.

2 Validación de un Método por Cromatografía de Gases para la Determinación de los Ácidos Grasos que Comprenden el D-004 ingrediente activo. Eduardo A. Rodríguez-Leyes, David Marrero Delange, Víctor L. González Canavaciolo, Roxana Sierra Pérez y Yuliammy Adames Fajardo. Revista de Ciencias Químicas. Vol. 4. No. 1. 2009; divulga (Fl. 111-116, resumen) un método por cromatografía de gases para la determinación de los ácidos grasos en el D-004. Los ácidos grasos fueron analizados como ésteres metílicos, obtenidos por reacción con cloruro de acetileno al 19% en metanol.

D3 EN 14103 (Fatty Acid Methyl Esters in B100 Biodiesel by Gas Chromatography). Tomothy Ruppel, Timon Huybrighs. PerkinElmer, Inc. USA. 2008; divulga (Fls. 75-78, objeto) un procedimiento para el análisis del contenido de ésteres metílicos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama.

D4 NTC 5013 (Grasas y Aceites vegetales y animales. Análisis de los esteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Bogotá. 2001; divulga (Fls. 63-69, objeto) pautas generales para la aplicación de la cromatografía de gases, usando columnas empacadas o capilares, para determinar la composición cuantitativa y cualitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos, bajo la norma, ISO 5508:1990 (Grasas y aceites animales y vegetales - Análisis por cromatografía de gases de metil ésteres de ácidos grasos). Organización Internacional para la Estandarización. 1990.

7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

El siguiente examen de patentabilidad se realizó teniendo en cuenta las objeciones señaladas en los numerales 3 y 4 de la presente comunicación.

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 1 consiste en un método que se caracteriza por, cuantificar el contenido de metil ésteres de ácidos grasos en porcentaje másico, utilizando un cromatógrafo de gas con detector FID.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2	D3	D4
Método que se caracteriza por,	Método para determinar el contenido de éster y éster metílico del ácido linoleico contenido en ácidos grasos de ésteres metílicos (FAME) (resumen).	Método por cromatografía de gases para la determinación de los ácidos grasos en el D-004 (Fl. 111, resumen).	Procedimiento de análisis por cromatografía de gases de metil ésteres de ácidos grasos en B100 Biodiesel (Fl. 75, título).	Procedimiento de análisis De los ésteres metílicos de los ácidos grasos pro cromatografía de gases (Fl. 65, título).
Cuantificar el contenido de	Determinar el contenido de éster y	Los ácidos grasos fueron analizados	Determinar el contenido de éster y	Determinar la composición

metil ésteres de ácidos grasos en porcentaje másico, utilizando un cromatógrafo de gas con detector FID.	éster metílico del ácido linoleico contenido en ácidos grasos de ésteres metílicos (FAME) por cromatografía de gases con un split/splitless de entrada y detector de ionización en llama FID (resumen).	como ésteres metílicos usando un equipo de cromatografía de gases GC 14A (Shimadzu, Japan) con detector de ionización por llama (Fl. 112 Col. 1, líneas 62-64).	éster metílico del ácido linoleico contenido en ácidos grasos de ésteres metílicos (FAME) por cromatografía de gases con detector de ionización en llama FID (Fl. 76. Col. 1).	cuantitativa y cualitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (Fl. 65, Párr. 1). El procedimiento hace referencia al equipo usualmente utilizado para cromatografía de gases que debe estar equipado con un detector de ionización de llama (FID) (Fl. 66, líneas 8-15)
--	---	---	--	--

De acuerdo con el cuadro anterior donde se comparan las características técnicas de la reivindicación 1 con las anterioridades D1, D2, D3 y D4 se concluye que el método ya era conocido en el estado de la técnica como se evidencia en las anterioridades encontradas. Por lo anterior la reivindicación 1 no es nueva.

Respecto a las reivindicaciones dependientes, del documento D1 se determina: reivindicación 2, estándar de calibración solución de heptanodecanato de metilo y n-heptano (Fl. 81, Col. 1); reivindicación 8, temperatura del detector de ionización en llama FID de 300 °C (Fl. 81, Col. 1); reivindicación 7, las condiciones de temperatura del horno cromatográfico durante el análisis es 210°C por 9 minutos y 20°C/min hasta 230°C por 10 minutos (Fl. 81, Col. 1) y reivindicación 9, la relación Split 80:1 (Fl. 81, Col. 1).

Del documento D2 se determina: reivindicaciones 4 y 5, el contenido de metil ésteres se determina por la siguiente ecuación (Fl. 112 y 113):

Donde,

$$C_i = \frac{A_i \times f_i^m \times m_{pi} \times 100}{A_{pi} \times m_m} \quad (\%)$$

- A_i: área bajo el pico cromatográfico del componente a analizar.
- m_{pi}: masa del patrón interno (mg)
- A_{pi}: área bajo el pico cromatográfico del patrón interno.
- f_i^m: factor másico de respuesta relativa.
- m_m: masa de la muestra.

Reivindicación 6, determinación del contenido de metil ésteres con cadenas carbonadas entre 8 y 18 átomos de carbono (Fl. 111, resumen).

Del documento D4 se determina, reivindicación 6, es posible determinar ácidos grasos con menos de 12 carbonos, o con temperatura más alta cuando se determinen ácidos grasos con más de 20 átomos de carbono (Fl. 68, líneas 25-27).

Por tanto, las reivindicaciones dependientes 2 a 10, no mencionan alguna característica que haga nuevo el método de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Artículo 1	1 - 10	Novedad
D2	Artículo 2	1, 4 y 5	Novedad
D3	Artículo 3	1	Novedad
D4	Artículo 4	1 y 6	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante para sesenta (60) días y presentarla por escrito.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 23 Oct. 2012

Elaborado por: Yenny Marcela Campos Borda 
Revisado por: Rosa Patricia Téllez 

Validación de un método por Cromatografía de Gases para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo

Eduardo A. Rodríguez-Leyes, David Marrero Delange,* Víctor L. González Canavaciolo, Roxana Sierra Pérez y Yuliamny Adames Fajardo.

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

Recibido: 20 de junio de 2008. Aceptado: 7 de octubre de 2008.

Palabras clave: D-004, ácidos grasos, cromatografía gaseosa, validación, *Roystonea regia*.
Key words: D-004, fatty acids, gas chromatography, validation, *Roystonea regia*.

RESUMEN. El D-004 es un nuevo ingrediente activo obtenido a partir de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), el cual ha demostrado su efectividad en modelos experimentales de hiperplasia prostática. Esta sustancia está compuesta principalmente por una mezcla de ácidos grasos (AG) saturados e insaturados libres, entre 8 y 18 átomos de carbono. Se desarrolló y validó un método por cromatografía gaseosa para la determinación de los AG en el D-004. Los AG fueron analizados como ésteres metílicos, obtenidos por reacción con cloruro de acetilo al 10 % en metanol y separados en una columna capilar *widebore* BPX-5 utilizando ácido tridecanoico como patrón interno. En el estudio de especificidad se demostró que no hubo interferencias en la determinación de esta mezcla, una vez que las muestras fueron sometidas a condiciones de estrés. La determinación del contenido de AG totales fue lineal ($r > 0.999$; CVs de los factores de respuesta y la pendiente menores que 5 y 2 %, respectivamente) y sin sesgo en todo el intervalo estudiado, desde 50 a 150 % de la masa nominal. Se obtuvieron recobrados elevados en el estudio de exactitud (100.4 a 100.8 %), realizado en un intervalo de 80 a 120 % de la concentración nominal. Se obtuvieron buenos resultados en los estudios de repetibilidad y precisión intermedia (CV < 2 %), lo que probó que el método es preciso. Conforme a estos resultados, el procedimiento validado es apropiado para el control de calidad y los estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

ABSTRACT. D-004 is a new active ingredient obtained from the Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits. This substance is mainly composed by a mixture of saturated and unsaturated free fatty acids, from 8 to 18 carbon atoms, and has shown to be effective in experimental model of prostate hyperplasia. A capillary gas chromatographic method for the determination of the fatty acids in D-004 was developed and validated. The acids were analyzed as methyl ester derivatives, which were obtained by reaction with 10 % acetyl chloride in methanol and separated in a BPX-5 wide-bore column using tridecanoic acid as internal standard. The specificity study showed no interferences regarding the determination of this mixture, once the samples were submitted to stress conditions. Determination of the total fatty acid content was linear ($r > 0.999$; CVs of the response factors and of the slopes lower than 5 and 2 %, respectively) and without bias in the studied concentration range, from 50 to 150 % of the nominal mass. In the accuracy study, over the range 80 to 120 % of the nominal fatty acid concentration, high recoveries (100.4 to 100.8 %) were reached. Good results were obtained in the repeatability and intermediate precision studies (CV < 2 %), proving that the method is precise. These results support that this method is properly validated, being appropriate for the quality control and stability studies of this active ingredient.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una de las patologías más frecuentes en los hombres con más de 50 años y su frecuencia se incrementa con la edad. Hoy día los medicamentos de primera elección para el tratamiento de la HPB son los inhibidores de la 5-alfa reductasa prostática y los bloqueadores de los receptores alfa₁-adrenérgicos de origen sintético.¹ Por otra parte, existen al-

gunas sustancias de origen vegetal como el extracto lipídico de saw palmetto (*Serenoa repens*), que también son ampliamente empleados en el tratamiento de esta patología.² Teniendo en cuenta estos antecedentes, queda justificada la búsqueda de medicamentos eficaces, seguros y bien tolerados a partir de fuentes existentes en el país para la terapia y prevención de la HPB, los cuales podrían incrementar la expectativa y la calidad de vida de la población cubana.

*Correspondencia:

David Marrero Delange

correo electrónico: david.marrero@cnic.edu.cu o david_delange@yahoo.com

El D004 es un nuevo ingrediente activo que consiste en un extracto lipídico de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), el cual ha demostrado efectividad en modelos experimentales de HPB.^{3,5} Esta sustancia está compuesta por una mezcla de ácidos grasos (AG) libres entre 8 y 18 átomos de carbono, siendo los ácidos oleico, láurico, palmítico y mirístico los componentes mayoritarios.

El desarrollo de un nuevo ingrediente activo lleva implícito, entre otros requerimientos químico farmacéuticos, contar con métodos analíticos suficientemente exactos y precisos para su control de la calidad y sus estudios de estabilidad. Actualmente, los AG son analizados principalmente por Cromatografía de Gases (CG) en forma de ésteres metílicos y separados por columnas capilares.^{6,7} Teniendo en cuenta que en este tipo de extracto lipídico la actividad farmacológica se le atribuye fundamentalmente a los AG saturados ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$),²⁻⁵ en el presente trabajo se decidió desarrollar y validar una metodología para la determinación de los AG que componen el D-004 ingrediente activo por CG empleando una columna apolar, la cual permite la determinación individual de los AG saturados y la conjunta de los AG insaturados con igual número de átomos de carbono. El procedimiento propuesto fue validado siguiendo criterios bien establecidos⁸⁻¹¹ para asegurar su aplicación en el control de la calidad y estudios de estabilidad de dicha sustancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y disoluciones

D-004 ingrediente activo (lote 020205) obtenido en el Departamento Química del Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Ciudad de La Habana). Patrones de los ácidos decanoico (cáprico, $C_{10:0}$), dodecanoico (láurico, $C_{12:0}$), tetradecanoico (mirístico, $C_{14:0}$), hexadecanoico (palmítico, $C_{16:0}$), 9-octadecenoico (oleico, $C_{18:1}$), octadecanoico (estearico, $C_{18:0}$), tridecanoico ($C_{13:0}$) y ésteres metílicos de los ácidos octanoico (caprílico, $C_{8:0}$), 9-hexadecenoico (palmitoleico, $C_{16:1}$) y 9-octadecenoico (oleico, $C_{18:1}$).

Disolución metilante (DME) de cloruro de acetilo 10 % en metanol.

Disolución de hidróxido de sodio en agua ($NaOH-H_2O$) 2 mol/L.

Disolución acuosa de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 %.

Disolución matriz de referencia (DMR). Se pesaron con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 10 mg de cada uno de los ácidos siguientes: $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ y $C_{18:0}$ en un tubo de ensayos y se aplicó la metodología analítica.

Disolución de Referencia de ácidos (DRA). Se pesaron 15,37; 452,61; 188,10; 247,12; 53,38 y 829,00 mg de los ácidos $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$ y se disolvieron en 100 mL de n-hexano.

Disolución de patrón interno (DPI). Se pesó con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 1 g de $C_{13:0}$ y se disolvió en 100 mL de metanol.

En el estudio se emplearon patrones de SIGMA (St. Louis, MO, USA); reactivos y disolventes (MERCK, Darmstadt, Alemania) y agua destilada.

Equipos

Cromatógrafo de gases GC 14A (Shimadzu, Japón) con detector de ionización por llama (DILL), acoplado a sistema de cómputo (Konixbert, Barcelona, España), con columna capilar *wide-bore* con fase enlazada BPX-5 (30 m x 0,53 mm d.i. y 1,5 μ m de espesor de película, SGE, Aus-

tralia). Programación: de 120 (2 min) a 320 °C, a 10 °C/min. Flujo del gas portador (H_2): 8 mL/min. Temperatura del detector y el inyector: 320 °C y volumen de inyección: 1 μ L en modo *splitless*.

La especificidad del método se comprobó por CG-Espectrometría de Masas (CG-EM). Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N con detector selectivo de masas 5975 B *Inert* acoplado a un sistema de cómputo y con columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de espesor de película. Agilent Technologies, CA, USA). Programación: de 70 °C (1 min) a 180 a 20 °C/min, de 180 a 230 °C a 2 °C/min, y de 230 a 320 °C a 20 °C/min. Temperatura del inyector: 300 °C, y volumen de inyección: 0,5 μ L en modo *splitless*. Flujo del gas portador (He): 1 mL/min. Temperaturas de la fuente, la interfase y el cuadrupolo fueron 250, 300 y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue 70 eV. El espectro de masas fue adquirido continuamente de 40 a 800 m/z en modo *scan*.

Preparación de la muestra

En un tubo de ensayos se pesaron, con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 100 mg de D-004. Se agregó 1 mL de la DPI, 3 mL de DME, 5 mL de n-hexano y se cerró herméticamente. Se colocó en un termostato seco a 85 °C durante 30 min con agitación vigorosa ocasional. Se sacó del termostato y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 3 mL de la disolución de NaOH. Se agitó en la zaranda durante 15 min. Se dejó reposar durante 2 min para separar las fases y se extrajo una alícuota de 1 mL de la fase orgánica (superior) hacia un vial, se reconstituyó con 1 mL de hexano, se cerró y se agitó manualmente durante 30 s. Finalmente se tomó 1 μ L por la técnica de *solvent-flush* para el análisis por CG.⁸

Método de análisis cualitativo

Como criterio de identificación por CG-DILL se determinó la retención relativa de cada uno de los ácidos siguientes: $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ y $C_{18:0}$, para lo cual se tomó como referencia al patrón interno $C_{13:0}$. La retención relativa determinada fue comparada con la obtenida del análisis de sus patrones comerciales como ésteres metílicos. La identificación fue corroborada por CG-EM a través de la comparación de los espectros de cada AG con los de los patrones comerciales y los que aparecen en la biblioteca Wiley. Los fragmentos característicos (principalmente, m/z 74, 87, 143) e iones moleculares (M^+) de los ésteres metílicos de los AG fueron examinados e interpretados.

Método de análisis cuantitativo

La determinación cuantitativa se realizó por el método del patrón interno, previo cálculo de los f_i^m a partir de la DMR y utilizando como referencia al patrón interno $C_{13:0}$. Los ácidos linoleico ($C_{18:2}$) y linolénico ($C_{18:3}$) se cuantificaron como ácido oleico ($C_{18:1}$), para el ácido $C_{8:0}$ se utilizó el f_i^m calculado para el ácido $C_{10:0}$ y para el ácido palmítoleico ($C_{16:1}$) se utilizó el f_i^m calculado para el ácido $C_{16:0}$.

El contenido de cada compuesto (C_i) en el D-004 se determinó por el método del patrón interno,¹² mediante la ecuación siguiente:

$$C_i = \frac{A_i \times f_i^m \times m_{pi} \times 100}{A_{pi} \times m_m} \quad (\%)$$

donde:

A_i área bajo el pico cromatográfico del componente a analizar.

m_{pi} masa de patrón interno (mg).

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

f_i^m factor másico de respuesta relativa.

m_m masa de la muestra.

El contenido total de D-004 se determinó por la sumatoria de los porcentajes individuales hallados. Los f_i^m se calcularon a partir del análisis cromatográfico de la DMR.

Validación

Aplicabilidad del sistema. Se realizaron seis réplicas de inyección de una muestra de D-004 siguiendo la preparación descrita anteriormente. A partir de los cromatogramas obtenidos se determinó: la resolución cromatográfica entre los ácidos $C_{16:0}$ - $C_{16:1}$ ($n = 3$), la cual debía ser mayor o igual a 1; la retención relativa de cada ácido ($n = 3$), la que debía coincidir con la calculada con cada patrón y la repetibilidad de la inyección, para la cual el CV % de la cuantificación total ($n = 6$) debía ser menor que 0,8 %.

Especificidad. La especificidad del método fue determinada al comparar los cromatogramas del D-004, el estándar interno y las muestras de D-004 sometidas a condiciones propicias a la ocurrencia de degradación. Estas condiciones fueron: termólisis (103 °C, 7 d), oxidación (1 g de D-004 en 1,5 mL de H_2O_2 al 30 % a 25 °C, 7 d), y fotólisis (254 nm a 25 °C, 7 d); y se llevaron a cabo en ampollitas de vidrio neutro, a las cuales se les insufló nitrógeno y se sellaron ($n = 3$). La pureza cromatográfica de las señales fue comprobada por CG-EM.

Linealidad. El estudio constó de cinco puntos, con tres réplicas cada uno. Estos puntos representaron el 50, 80, 100, 120 y 150 % de la masa de D-004 que se emplea en el análisis de las muestras, por lo que se pesaron alrededor de 50, 80, 100, 120 y 150 mg de D-004 y posteriormente, se procedió con la preparación descrita anteriormente. A partir de las masas analizadas y las áreas obtenidas, se calculó la ecuación de regresión: $y = b x + a$, por el método de los mínimos cuadrados. Para ello, se graficaron las relaciones de áreas obtenidas ($y = A_i/A_{pi}$) en función de las relaciones de masas añadidas ($y = m_i/m_{pi}$), donde A_i y m_i son el área y la masa del total de AG y A_{pi} y m_{pi} son el área y la masa del patrón interno. Se realizaron pruebas estadísticas ($p = 0,05$) para comprobar la linealidad y proporcionalidad, para lo cual se debían cumplir los criterios siguientes: coeficiente de correlación (r) $\geq 0,990$, coeficientes de variación de los factores de respuesta (CV_p) y de la pendiente (CV_y) ≤ 5 % y ≤ 2 %, respectivamente. Además, los límites de confianza del intercepto (a) debían incluir el cero.⁸⁻¹¹

Exactitud. La exactitud se evaluó por un estudio de recobrado en un intervalo de 80 a 120 % de la concentración nominal de AG. Se aplicó el método de Adición de Patrón, para lo cual se utilizó la DRA, la cual simula la proporción en que se presentan estos AG en el D-004. De esta disolución, se tomaron 1, 2 y 3 mL y se añadieron a tubos de ensayos ($n = 3$). Luego se llevaron a sequedad a 40 °C con un flujo suave de N_2 y se adicionaron 60 mg aproximadamente de D-004. Se analizaron en paralelo las muestras de D-004 sin y con adición de la mezcla patrón de AG. La diferencia de resultado de "muestra + patrón" menos "muestra" se comparó con la cantidad añadida. Con el objetivo de comprobar si la concentración afectaba los resultados se realizó una prueba de Cochran para $p = 0,05$. Los recobrados fueron calculados [(cantidad encontrada/cantidad añadida) x 100 %] y

se les realizó una prueba t de Student ($p = 0,05$) para comprobar si existían diferencias significativas con el 100 %, según la ecuación siguiente:⁸⁻¹¹

$$t_{exp.} = \frac{|100 - \bar{R}|}{CV} \sqrt{n}$$

donde:

$\bar{R}$ recobrado promedio obtenido.

n número de réplicas.

Precisión. Este parámetro se determinó mediante ensayos de repetibilidad (un mismo analista realizó 10 réplicas de análisis de la misma muestra, en el mismo día y en el mismo equipo) y de precisión intermedia (dos analistas analizaron tres muestras independientes con cuatro réplicas en tres días diferentes, en el mismo equipo). Se calcularon los CV (%) de la determinación de cada ácido y del contenido total, y se halló además, el límite de confianza ($LC = media \pm t \times DE/n^{1/2}$) de la determinación del contenido total de ácidos para $p = 0,05$. Para determinar si hubo diferencias significativas, se realizó una prueba ANOVA de dos vías ($p = 0,05$). Además, se consideró como criterio que los CV deberían ser ≤ 2 %.⁸⁻¹¹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento analítico permitió una determinación rápida, confiable y reproducible de los AG que componen el D-004 ingrediente activo. Debido a que los f_i^m de los AG individuales estuvieron alrededor de la unidad, por lo que se asumió que el $f_i^m = 1$ para el cálculo cuantitativo de cada AG, lo cual coincide con lo descrito para el análisis de AG por CG con DILL^{8,7} y demuestra que en el proceso de inyección no ocurren efectos discriminatorios.

Al estudiar la aplicabilidad del sistema, se comprobó que la resolución cromatográfica entre los ácidos $C_{16:1}$ y $C_{16:0}$ en las tres determinaciones fue mayor que el límite de aceptación (1,0); lo cual garantizó una separación adecuada de las señales de interés (Fig. 1, tabla 1). La determinación del contenido total de AG en las seis réplicas de inyección presentó un CV de 0,5 %, inferior al límite de aceptación (0,8 %). También, las retenciones relativas calculadas ($n = 3$) coincidieron con las obtenidas para los patrones de referencia, todo lo cual permitió comprobar que el sistema analítico cumplía con los criterios de aplicabilidad para ser utilizado en la validación del método.

Especificidad. En los cromatogramas obtenidos, se observó una adecuada resolución entre las señales correspondientes a los AG que componen el D-004 ingrediente activo. No se detectó interferencia con el patrón interno $C_{13:0}$ (Fig. 1), lo cual permitió su empleo como sustancia de referencia. Al analizar los cromatogramas de las muestras sometidas a condiciones de estrés no se observó la aparición de ninguna señal que interfiriera con los analitos de interés (Fig. 2). A su vez, se comprobó por CG-EM la pureza cromatográfica de las señales correspondientes a las muestras analizadas, con lo que se descartó el solapamiento de posibles productos de degradación u otras interferencias con los AG que componen el D-004. El método, por tanto, demostró ser específico para el análisis del D-004, incluso al ser este sometido a condiciones extremas, por lo que puede ser utilizado en estudios de estabilidad.

Linealidad. La ecuación de regresión calculada a partir de relaciones de masas analizadas y las relaciones de áreas obtenidas (Tabla 2) para el total de AG fue:

$$y = (0,914 \pm 0,012) x - (0,080 \pm 0,121),$$

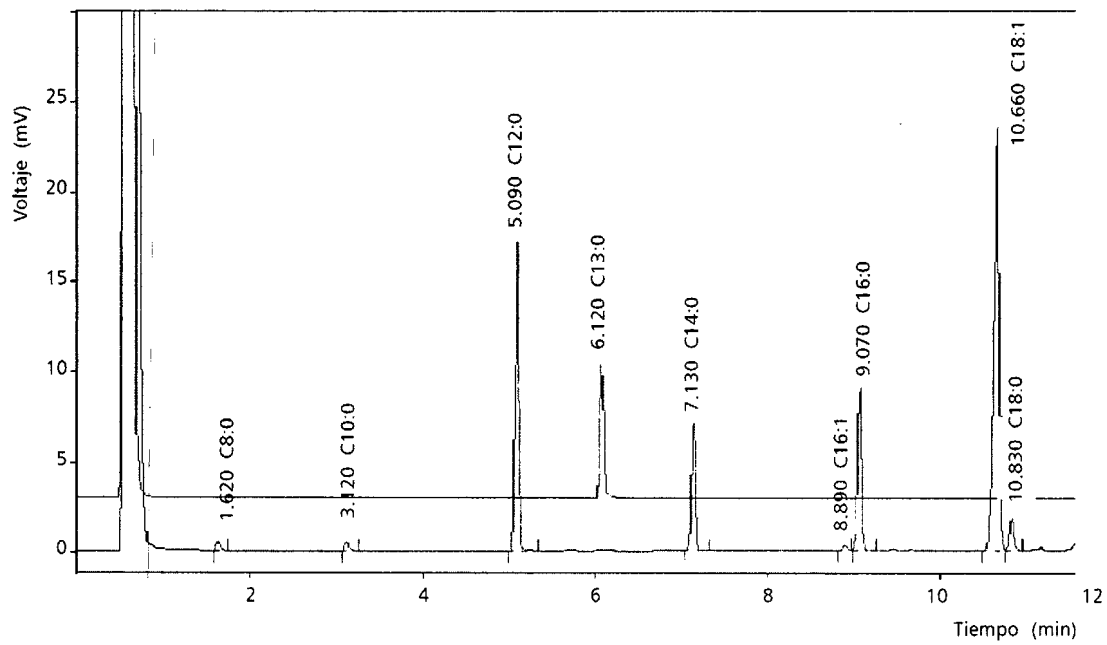


Fig. 1. Superposición de los perfiles cromatográficos de D-004 (superior) y ácido tridecanoico (C13:0) utilizado como estándar interno. Todos analizados como ésteres metílicos.

Tabla 1. Resolución cromatográfica C_{16:1}-C_{16:0} (n = 3) y cuantificación (n = 6).

Réplica	Contenido de AG (%)	
	R _{16:1-16:0}	
1	1.47	90.6
2	1.50	90.8
3	1.54	91.2
4	—	90.9
5	—	91.6
6	—	91.7
CV (%)		0.5

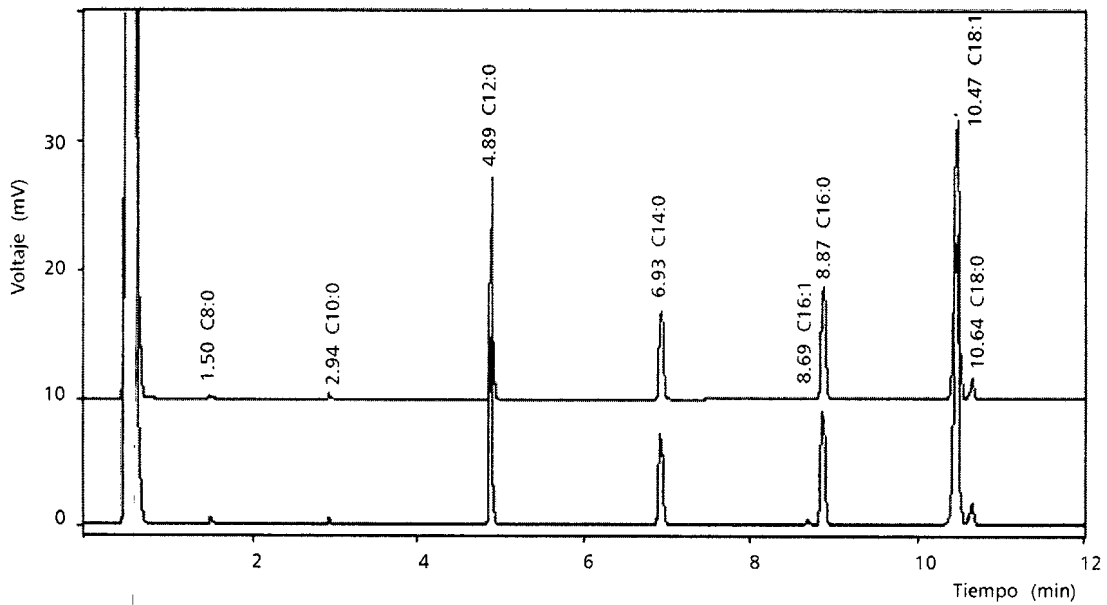


Fig. 2. Superposición de perfiles cromatográficos de D-004 (superior) y D-004 sometido a condiciones de degradación (termólisis).

Tabla 2. Resultados del ensayo de linealidad del método.

m/m_{pi}	A/A_{pi}
4,7	4,2
5,0	4,5
4,9	4,4
8,2	7,3
8,0	7,3
8,2	7,4
10,1	9,2
10,0	9,1
10,1	9,2
12,2	11,0
12,2	11,0
12,1	11,0
14,7	13,4
14,8	13,5
14,7	13,4

Tabla 3. Resultados del estudio de exactitud del método (n = 3)

Añadida	Masa Encontrada			Recobrado medio (%)	t_{exp}
	(mg)	1	2		
17.9	17.4	18,6	17.8	100.4	0.23
35.7	36.4	36,1	35.5	100.8	1.19
53.6	52.9	55,3	53.6	100.6	0.48
Total				100,6	0.93

Tabla 4. Resultados del ensayo de repetibilidad (n = 10).

AG	Media ± DE (%)	CV
C _{8:0}	0,7 ± 0,05	7,1
C _{10:0}	0,7 ± 0,00	0,0
C _{12:0}	22,8 ± 0,18	0,8
C _{14:0}	9,6 ± 0,05	0,5
C _{16:1}	0,4 ± 0,00	0,0
C _{18:0}	12,4 ± 0,08	0,7
C _{18:1} ^a	41,8 ± 0,23	0,6
C _{18:0}	2,6 ± 0,05	1,9
Total	91,0 ± 0,42	0,4

^a Incluye los ácidos C_{18:2} y C_{18:3} reportados como ácido C_{18:1}

con intervalos de confianza calculados para un 95 % de confiabilidad. El coeficiente de correlación ($r = 0,999$) fue superior al límite de aceptación (0,990), el CV de los factores de respuesta ($CV_r = 0,8 \%$) y el CV de la pendiente ($CV_b = 0,6 \%$) fueron menores que los límites de aceptación (5 y 2 %, respectivamente), y el intervalo de confianza del intercepto incluyó el cero, indicando la ausencia de sesgo. Dichos parámetros cumplieron con los criterios exigidos.⁸⁻¹¹ por lo que se pudo considerar que el método es lineal en el intervalo de masas estudiado.

Exactitud. En este ensayo los recobrados promedios obtenidos estuvieron entre 100,4 y 100,8 % (Tabla 3). Al aplicar la prueba estadística t se encontró que no había diferencias significativas entre los recobrados y el 100 %, al ser las t_{exp} inferiores a las t tabuladas para un 95 % de confiabilidad (4,30 para los puntos individuales y 2,31 para el promedio). También se detectó que las varianzas de las determinaciones en las diferentes concentraciones utilizadas eran equivalentes, al ser la G_{exp} (0,59) < G_{tab} (0,87), lo cual indica que el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados. En tal sentido, se encontró que existía una adecuada correlación entre las masas teóricas y las encontradas en la práctica (mg), al ser $r = 0,999$ y $p < 0,000$ 1. La ecuación de regresión fue:

$$y = (1.016 \pm 0.041) x - (0.241 \pm 1.575),$$

lo cual demuestra que la pendiente incluye al 1 y al quedar incluido el cero en el intervalo de confianza del intercepto no existe sesgo.⁸⁻¹¹ Estos resultados confirman que el método es exacto en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

Precisión. En el ensayo de repetibilidad los CV variaron de la forma esperada, de acuerdo con los contenidos individuales de los AG del D-004 (Tabla 4). Así, la dispersión más alta se obtuvo para el componente que se encuentra en menor proporción: el C_{8:0}, sin embargo esto no afectó la dispersión de la determinación para el total, cuyo CV = 0,4 % asegura la repetibilidad de los resultados al ser aplicado el método, pues es inferior al límite de aceptación comúnmente exigido para este tipo de análisis (2 %).⁸⁻¹¹ Al estudiar la precisión intermedia (Tabla 5), la determinación realizada por los dos analistas en los tres días de estudio (n = 24) presentó un CV = 0,6 %, resultado inferior al límite de aceptación (2 %);² lo que indica que los factores *analista* y *día* no influyeron en la precisión de los análisis. También se constató, mediante la prueba de ANOVA, ausencia de diferencias significativas entre ambas series de resultados en cuanto a la determinación del contenido

Tabla 5. Resultados del ensayo de precisión intermedia.

Réplicas	Contenido de AG (%)					
	Analista 1			Analista 2		
	Día		3	Día		3
	1	2		1	2	
1	90.5	90.7	90.4	90.4	90.5	90.0
2	91,1	91,5	90,4	91,3	90,1	90,2
3	91,6	90,8	90,6	91,6	90,0	89,3
4	90,6	90,8	89,9	91,1	91,1	90,8
Media (%) ± DE	90,7 ± 0,48			90,5 ± 0,66		
CV (%)	0,5			0,7		

de AG totales ($p = 0,43$), lo cual confirma la adecuada precisión del método. Los LC calculados en este ensayo fueron: $(90,6 \pm 0,3) \%$.

CONCLUSIONES

El método analítico propuesto para la determinación del contenido de los AG en el D-004 ingrediente activo, cumplió con los requerimientos para considerarse validado, demostrando ser específico, lineal, exacto y preciso. De esta manera el método puede ser utilizado en el proceso de control de calidad y estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhargava S., Canda A.E. and Chapple C.R. A rational approach to benign prostatic hyperplasia evaluation: recent advances. *Curr. Opin. Urol.*, **14**, 1-6, 2004.
2. Bent S., Kane C., Shinohara K., Neuhaus J., Hudes E.S., Godelberg H. and Avins A.L. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. *N. Engl. J. Med.*, **354**, 557-566, 2006.
3. Laguna A., *et al.* Extracto obtenido a partir de frutos de *Roystonea regia* utilizado contra la hiperplasia prostática y la prostatitis, La Habana, Cuba, Patente No. 5239/2007.
4. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Mas R., *et al.* Effects of D-004, a Lipid Extract from Cuban Royal Palm Fruit, on Inhibiting Prostatic Hyperplasia Induced with Testosterone

- or Dihydrotestosterone in a Rat Model: A Randomized, Controlled Study. *Curr. Ther. Res.*, **65**, 505-514, 2004.
5. Carbajal D., Molina V., Mas R. and Arruzazabala M.L. Therapeutic effect of D-004, a Lipid Extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced rats. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **31**, 193-197, 2005.
6. Marrero D. Obtención y determinación de ácidos grasos de muy elevada masa molecular. *Revista CENIC Ciencia Químicas*, **37**, 23-33, 2006.
7. Christie W.W. The preparation of derivatives of fatty acids. In *Gas Chromatography and Lipids-A Practical Guide*. Christie W.W. (ed.) Scotland, The Oily Press, 64-84, 1989.
8. Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J. and Vicente L. Validation of analytical methods; Spanish Association of the Industry Pharmacists, Catalan Section, Edited under HP license, 31, 1989.
9. Green C. A step-by-step approach to establishing a method validation program. *J. Validation Technology*, **6**, 622-33, 2000.
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B. 1996.
11. Regulación No. 41-2007 "Validación de métodos analíticos", Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba, 2007.
12. Novák J. Quantitative Analysis by Gas Chromatography. Second Edition, Cazes J. (ed.) New York, Marcel Dekker, 79-135, 1988.