



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

MÁSTER INTERNACIONAL EN TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

MITA

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOESTEROLES
EN SEMILLAS DE MANÍ POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

**Tesis para optar al grado de Máster Internacional en Tecnología de los
Alimentos de Claudio Gabriel Aquilano**

Directora: Dra. María José Martínez

Co Directora: Bioq. MSc. Nora Mabel Percibaldi

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**FACULTAD DE AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

AÑO 2023

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Dr. María José Martínez y MSc. Nora Mabel Percibaldi, por su colaboración y transferencia de conocimientos, aportes fundamentales para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Calidad de Alimentos Suelos y Agua de la EEA Pergamino y a la Dra. Ana María Di Martino por su gestión ante la Red de Calidad e Inocuidad de Alimentos de INTA (2019-RIST-E7-I167-001) por brindar los fondos para la instalación de espectrómetro de masa.

Al proyecto INTA (E7 2019-PE-E7-I517-001 "Calidad nutricional y sensorial de alimentos y aptitud tecnológica de materia prima asociada a sistemas y territorios productivos con foco en las demandas del consumidor. - Línea "Identificación de propiedades fisicoquímicas y nutricionales de las variedades de garbanzo, poroto, arveja y maní mejorados por INTA, y sus mezclas para elaboración de alimentos enriquecidos en proteínas y fitonutrientes"). Este proyecto INTA continúa como 2023-PE-L04-I119.

Al equipo técnico de la empresa INNOVATEK, Axel Chiaro y Horacio Cavalleri por responder siempre mis consultas.

Al INTA por la posibilidad de realizar este posgrado.

A mi mujer Julieta y mi hijo Vicente por el apoyo incondicional en cada proyecto y decisión.

A todos ellos muchas gracias.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESÚMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1.Generalidades de las leguminosas	9
1.2. Cultivo de maní	9
1.3.Composición química del grano y beneficios para la salud asociado al consumo de maní ...	12
1.4.Formas de consumo y procesamiento del maní	14
1.5.Importancia de la determinación del contenido de fitoesteroles en las semillas de maní....	18
1.6.Técnica de cromatografía gaseosa para identificación y cuantificación de fitoesteroles en semillas de maní	21
1.7.Validación metodológica	21
1.8.Criterios de validación. Definiciones	22
1.9. Antecedentes	25
1.10. Hipótesis	25
1. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS	25
2.1. OBJETIVO GENERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
2. METODOLOGÍA	26
3.1. Material utilizado	26
3.2. Metodología	26
3.2.1. Instrumental y elementos de laboratorio	26
3.2.2. Drogas y Reactivos.....	27
3.2.3. Procedimiento técnico	28
3.2.4. Análisis CG-MS.....	29
3.3. Puesta en marcha de la metodología en el LCASyA	29
3.3.1. Acondicionamiento	29
3.3.2. Ejecución del método	29
3.3.3. Verificación del método.....	29
3.3.3.1. Determinación de la repetibilidad	30
3.3.3.2. Determinación de la reproducibilidad	30
3.3.3.3. Determinación de la veracidad.....	30
3.3.3.4. Identificación de los compuestos	31
3.3.3.5. Cuantificación de los compuestos	31

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1.	Puesta en marcha de la metodología	32
4.2.	Verificación del método.....	33
4.2.1.	Resultados y discusión de la prueba de repetibilidad	33
4.2.2.	Resultados y discusión de la prueba de reproducibilidad.....	34
4.2.3.	Resultados y discusión de la prueba de veracidad	34
4.2.4.	Resultados y discusión de la prueba de identificación	36
4.2.4.	Resultados y discusión de la prueba de cuantificación	40
4.	CONCLUSIÓN.....	41
5.	REFERENCIAS.....	42
6.	ANEXOS.....	45
7.1.	Curvas de calibración utilizadas en este experimento	45
7.2.	Tablas utilizadas para el método estadístico test de Student	47
7.3.	Tablas de resultados.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Planta de maní	9
Figura 2: Planta de maní con vainas	10
Figura 3: Maní con cáscara	14
Figura 4: Maní pelado tostado	14
Figura 5: Maní crocante	14
Figura 6: Maní recubierto con chocolate	14
Figura 7: Maní confitado	15
Figura 8: Pasta de maní	15
Figura 9: Mecanismo de absorción del colesterol y fitoesteroles en el organismo	19
Figura 10: Comparación de la exactitud y la precisión de un método analítico	23
Figura 11: Cromatógrafo gaseoso marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500 con detector de masa SQ8 e inyector PSS	26
Figura 12: Identificación del compuesto 5alfa-cholestan-3beta-ol	36
Figura 13: Identificación del compuesto estigmasterol	37
Figura 14: Identificación del compuesto beta-sitosterol	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Superficie sembrada por provincia y su % sobre el total	11
Gráfico 2: Consumo de frutos secos en Argentina	11
Gráfico 3: Destino de exportación del maní argentino	11
Gráfico 4: Capacidad antioxidante de los alimentos	14

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Composición química de la semilla de maní	12
Tabla 2: Procesamiento de las distintas presentaciones comerciales del maní	15
Tabla 3: Procesamiento para la obtención de maní crocante	16
Tabla 4: Procesamiento para la obtención de maní recubierto con chocolate	17
Tabla 5: Procesamiento para la obtención de maní confitado	17
Tabla 6: Ensayos involucrados en el análisis de repetibilidad	32
Tabla 7: Ensayos involucrados en el análisis de reproducibilidad	33
Tabla 8: Ensayos involucrados en el método de sesgo	34
Tabla 9: t Student para método de sesgo	46
Tabla 10: resultados del contenido de estigmasterol y beta-sitosterol en semillas de maní tostado	47
Tabla 11: t Student para método de cuantificación	46
Tabla 12: resultados del contenido de estigmasterol y beta-sitosterol en aceite de maní	47

RESÚMEN

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es la legumbre de mayor producción en el mundo, después de la soja, dado que provee una extraordinaria fuente de aceite, además de proteínas de buena calidad. Argentina es el mayor productor de América Latina y el séptimo en el mundo (FAO, 2023). Cerca del 80 % del cultivo de esta oleaginosa se localiza en la provincia de Córdoba y su producción reviste una gran importancia para la economía regional.

Esta leguminosa desempeña una función fundamental en la alimentación saludable y en la producción sostenible de alimentos. El maní es una importante fuente de aceite, proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas de alto valor nutricional. Además, contiene compuestos bioactivos, entre los que se destacan, los fitoesteroles que son beneficiosos para la salud. El maní tipo confitería utilizado como consumo humano directo, es una importantísima fuente de fitoesteroles anticancerígenos y con efectos hipocolesterolémico, según se reporta en la literatura internacional.

Conocer la composición de las materias primas es de sumo interés para el sector agroalimentario, por ello es necesario utilizar técnicas de identificación y cuantificación precisas para lograr productos terminados de mejor calidad nutricional.

La cromatografía gaseosa (CG) es una técnica que se basa en separar físicamente sustancias presentes en mezclas complejas de compuestos fácilmente volatilizables. La espectrometría de masa (MS) está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos esos iones se separan de acuerdo a su masa y su carga. Por lo tanto, combinación CG-MS permite la separación e identificación de mezclas complejas.

En el Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua (LCASyA) de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Pergamino se trabajó en la puesta a punto de una metodología para identificar y cuantificar el contenido de fitoesteroles en semillas de maní por cromatografía gaseosa, objetivo de esta tesis.

Se concluye que la metodología implementada es precisa, lo cual queda demostrado en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad y expresado por los coeficientes de variación. También, se demostró que trabajando con un nivel de confianza del 95 %, y 5 grados de libertad no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos al comparar valores teóricos y experimentales para la identificación y cuantificación de fitoesteroles por esta metodología. Se obtuvieron 44,31 mg de beta-sitosterol y 3,39 mg de estigmasterol cada 100 g de maní tostado que coincide con lo expresado en la bibliografía.

Palabras clave:

Maní, *Arachis hypogaea* L., fitoesteroles, cromatografía gaseosa, espectrometría de masa.

ABSTRACT

Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) are the most produced legume in the world, after soybeans, since they provide an extraordinary source of oil, as well as good quality proteins. Argentina is the largest producer in Latin America and the seventh in the world (FAO, 2023). About 80% of the cultivation of this oilseed is in the province of Córdoba and its production is of great importance for the regional economy.

This legume plays a fundamental role in healthy eating and sustainable food production. Peanuts are an important source of oil, proteins, carbohydrates, minerals and vitamins of high nutritional value. In addition, it contains bioactive compounds, among which phytosterols stand out, which are beneficial for health. Confectionery-type peanuts used for direct human consumption are a very important source of anti-cancer phytosterols with hypocholesterolemic effects, as reported in international literature.

Knowing the composition of raw materials is of great interest to the agri-food sector, which is why it is necessary to use precise identification and quantification techniques to achieve finished products of better nutritional quality.

Gas chromatography (GC) is a technique that is based on physically separating substances present in complex mixtures of easily volatilizable compounds. Mass spectrometry (MS) is based on obtaining ions from organic molecules in the gas phase. Once these ions are obtained, they are separated according to their mass and charge. Therefore, combined GC-MS allows the separation and identification of complex mixtures.

In the Food, Soil and Water Quality Laboratory (LCASyA) of the Agricultural Experimental Station of the National Institute of Agricultural Technology (INTA) Pergamino, work was carried out on the development of a methodology to identify and quantify the content of phytosterols in seeds of peanut by gas chromatography, objective of this thesis.

It is concluded that the implemented methodology is precise, which is demonstrated in the repeatability and reproducibility tests and expressed by the variation coefficients. Also, it was shown that working with a confidence level of 95% and 5 degrees of freedom there are no significant differences in the results obtained when comparing theoretical and experimental values for the identification and quantification of phytosterols by this methodology. 44.31 mg of beta-sitosterol and 3.39 mg of stigmasterol were obtained per 100 g of roasted peanuts, which coincides with what is expressed in the literature.

Keywords:

Peanut, *Arachis hypogaea* L., phytosterols, gas chromatography, mass spectrometry.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de las leguminosas

Las leguminosas o fabáceas son las plantas de las que se cosechan las legumbres, que son un fruto formado por una vaina que encierra en su interior una semilla o una hilera de semillas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

El Código Alimentario Argentino (CAA) en el capítulo XI define los alimentos vegetales. En el artículo 897 con los nombres de Maní o Cacahuete ñse entienden a las vainas de *Arachis hypogaea* L. y también las semillas sanas crudas o tostadas del mismo, peladas o cubiertas con su tegumento (CAA, 2013).

Las principales legumbres consumidas por los humanos son los porotos, garbanzos, arvejas, lentejas, habas, lupinos, maní y soja; mientras que las que se emplean para alimentar al ganado, se destacan: alfalfa, trébol y vicia entre otras (FAO, 2016a).

Aunque estas semillas comestibles son consumidas desde hace miles de años por seres humanos y animales, en general su valor nutricional no es reconocido adecuadamente y con frecuencia su consumo es menor a lo recomendado en Argentina. Esta falta de reconocimiento es innecesaria, puesto que las legumbres desempeñan una función fundamental en la alimentación saludable, en la producción sostenible de alimentos y, sobre todo, en la seguridad alimentaria (FAO, 2016a).

1.2. Cultivo de maní

El maní es una planta anual herbácea, erecta, ascendente de 15-70 cm de alto con tallos ligeramente peludos, con ramificaciones desde la base, que desarrolla raíces cuando dichas ramas tocan el suelo (**Figura 1**). Se reconocen dos grupos principales de variedades, las de planta erecta y las de tipo rastrero. Casi todas las formas que se cultivan comercialmente pertenecen al primer grupo.

Figura 1: Planta de maní



Fuente: Dra. María José Martínez

Esta semilla está contenida en el interior de vainas que crecen enterradas en el suelo, industrialmente denominadas ñcajasö, en cantidades de una a cuatro semillas por caja, dependiendo de la variedad cultivada (**Figura 2**).

Figura 2: Planta de maní con vainas



Fuente: Dra. María José Martínez

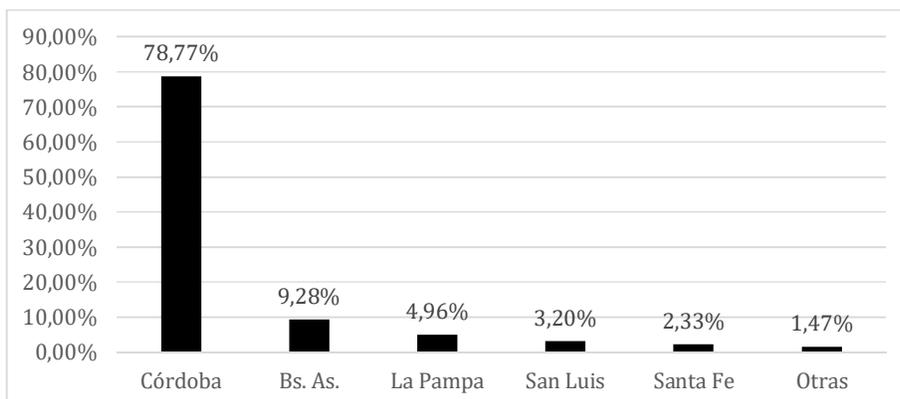
Según SISA (2021) la producción mundial de maní ronda los 45,5 millones de toneladas.

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es la legumbre de mayor producción en el mundo, después de la soja, dado que provee una extraordinaria fuente de aceite, además de proteínas de buena calidad. Argentina es el mayor productor de América Latina y el séptimo en el mundo (FAO, 2023). Cerca del 80 % del cultivo de esta oleaginosa se localiza en la provincia de Córdoba y su producción reviste una gran importancia para la economía regional. En segundo y tercer lugar siguen las provincias de Buenos Aires y La Pampa. En menor medida de producción siguen las provincias de San Luis, Santa Fe, Salta, Catamarca, Tucumán, Formosa y Santiago del Estero (SISA, 2021)(**Gráfico 1**).

Dentro del grupo de frutos secos en nuestro país, el maní es el más consumido (**Gráfico 2**). Su consumo oscila entre el 5 y 10% del total producido (Cámara Argentina del maní, 2023).

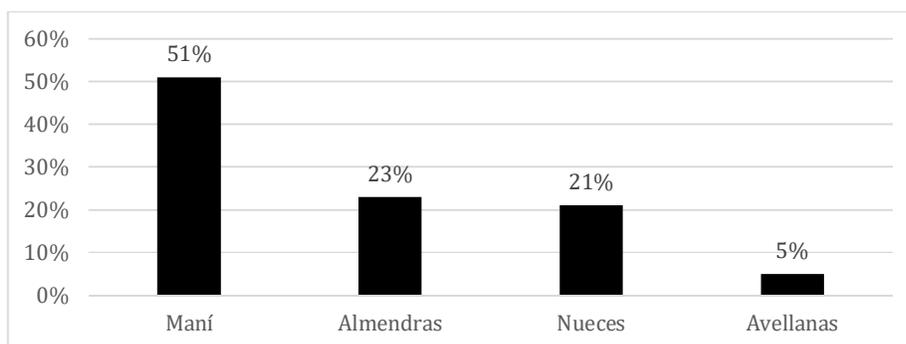
Argentina es el principal proveedor de maní del mercado europeo, considerando este producto argentino como el mejor del mundo (Universidad Nacional de Río Cuarto, 2017), siendo Países Bajos el principal importador de nuestros granos (**Gráfico 3**).

Gráfico 1: Superficie sembrada por provincia y su % sobre el total



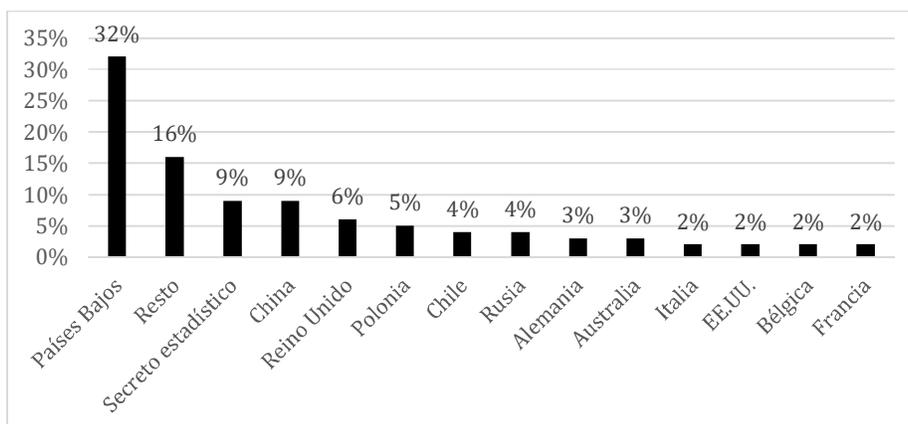
Fuente: SISA (2021).

Gráfico 2: Consumo de frutos secos en Argentina



Fuente: Cámara Argentina del maní (2023).

Gráfico 3: Destino de exportación del maní argentino



Fuente: Bolsa de Comercio de Rosario (2021).

1.3. Composición química del grano y beneficios para la salud asociado al consumo de maní

El maní es catalogado un superalimento porque contiene más nutrientes por caloría que la mayoría de los alimentos. Es decir, que el consumo frecuente de una pequeña porción nos proporciona alta concentración de nutrientes y consecuentemente efectos beneficiosos para la salud (Cámara Argentina del maní, 2023).

En la **Tabla 1** se detalla la composición química de semillas de maní, y puede observarse que es el fruto seco más denso en nutrientes. Posee alto contenido en grasas saludables, proteínas y la versión más adecuada de los carbohidratos, las fibras. En cuanto al perfil lipídico podemos decir que la mayor proporción corresponde a lípidos monoinsaturados, muy bajo contenido de ácidos grasos saturados y al ser un alimento de origen vegetal no contiene colesterol. Además, su consumo aporta más proteínas que cualquier otro fruto seco (U.S. Department of Agriculture, 2009).

Tabla 1: Composición química de semillas de maní

Tabla Nutricional	
Parámetros	Promedio
Energía (cal.)	570
Proteínas (g)	26
Carbohidratos totales(g)	16,6
Fibras (g)	7,9
Grasas (g)	48
Grasas Saturadas (g)	5,95
Grasas Monoinsaturadas (g)	38,54
Grasas Poliinsaturadas (g)	3,51
Vitamina E (mg)	8,1
Vitamina B9/ Folato (mcg)	240
Vitamina B3- Niacina (mg)	12,7
Vitamina B1- Tiamina (mg)	0,64
Vitamina B2- Riboflavina (mg)	0,13
Vitamina B5- Ácido Pantoténico (mg)	1,77
Vitamina B6- Piridoxina (mg)	0,35
Zinc (mg)	3,3
Cobre (mg)	0,9
Selenio (mcg)	6,9
Magnesio (mg)	175
Fósforo (mg)	395
Potasio (mg)	682
Calcio (mg)	65
Sodio (mg)	10
Hierro (mg)	2,9
Colesterol (mg)	0
Fitoesteroles totales (mg/100g)	116-130 *

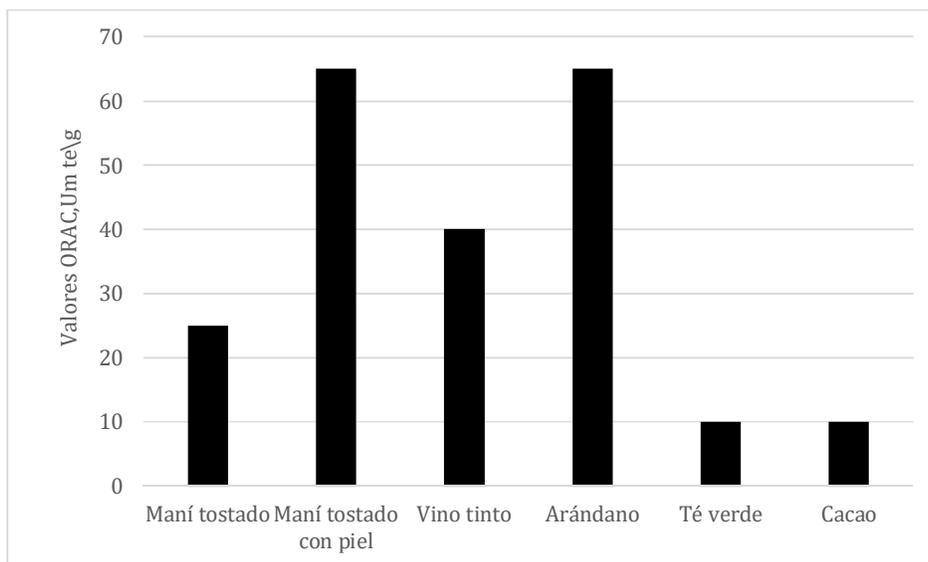
Fuente: FAO (2016b); Grosso (2020).* Shin *et al.* (2010).

Por otra parte, el maní es una excelente fuente de vitaminas y minerales. En relación a la capacidad antioxidante podemos decir que el consumo de 28 g de maní provee el 15% del valor diario de vitamina E para niños y para adultos. En el **grafico 4** se puede ver que el maní tostado con piel aporta contenido similar de vitamina E que el arándano y mucho más que el té verde y el cacao (Cámara Argentina del maní, 2023). Además, se destaca la importancia del consumo de la piel del maní en el aporte antioxidante.

Según Peanut Institute (2023) el maní además de ser un sabroso aperitivo aporta compuestos bioactivos que brindan beneficios importantes para los consumidores. Los compuestos bioactivos son elementos nutricionales que se encuentran presentes en algunos alimentos y ayudan a prevenir enfermedades, mejorar la longevidad, mantener saludable el sistema digestivo, endocrino, cardiovascular, inmunológico y nervioso. A continuación, se detallan los compuestos presentes en el maní y sus propiedades:

- Los fitoesteroles son compuestos que se encuentran en el reino vegetal y poseen estructura química similar al colesterol bloqueando la absorción de colesterol de la dieta, lo que puede reducir enfermedades del corazón. Su contenido varía dependiendo de la variedad genética y las condiciones ambientales. Hay estudios que demuestran que los ratones alimentados con una dieta rica en fitoesteroles redujeron el crecimiento del tumor de próstata en más del 40 por ciento. Además, corroborando estos estudios Awad *et al* (2009) encontraron que el beta-sitosterol tiene efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral y estimula la apoptosis celular, en el cáncer de colon, próstata y mama.
- La arginina está en mayor proporción que en cualquier otro alimento. La arginina es un aminoácido que reduce la presión arterial y mantiene las arterias flexibles.
- El resveratrol es un poderoso antioxidante que ayuda a prevenir el crecimiento de células cancerosas y reducir los niveles de colesterol malo (LDL), lo que puede prevenir enfermedades cardiovasculares.
- Los fenoles ayudan a reducir el envejecimiento y crecimiento de células cancerosas de la piel.
- Los flavonoides reducen la inflamación, previenen la formación de coágulos de sangre y protegen contra la diabetes, el cáncer y los trastornos neurológicos.
- La biotina presente en grandes cantidades es una vitamina que ayuda a mantener el cabello y la piel sana.

Gráfico 4: Capacidad antioxidante de los alimentos



Fuente: Cámara Argentina del maní (2023).

1.4. Formas de consumo y procesamiento del maní

El maní en madurez fisiológica es comercializado para su consumo en diferentes formas. Maní confitería y maní industria:

Maní confitería:

Como *snack* en sus diferentes versiones. Con cascara (**Figura 3**), pelado (**Figura 4**), crocante también llamado maní japonés (**Figura 5**), recubierto con chocolate (**Figura 6**) y confitado (**Figura 7**) y como pasta de maní para untar o para preparaciones culinarias (**Figura 8**).

Figura 3: Maní con cáscara



Fuente: <https://runrun.es>

Figura 4: Maní pelado tostado



Fuente: <https://www.almendraalmacenonline.com.ar/>

Figura 5: Maní crocante



Fuente: <https://www.cronista.com/>

Figura 6: Maní recubierto con chocolate



Fuente: <https://www.verdeolivanatural.com.ar/>

Figura 7: Maní confitado



Fuente: <https://extension.duoc.cl/>

Figura 8: Pasta de maní



Fuente: <https://entresano.com/>

La industria alimenticia para obtener **maní con cáscara, pelado** y **pasta de maní** lleva a cabo las etapas generales que se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Procesamiento de las distintas presentaciones comerciales del maní tipo confitería

ETAPAS DE LOS PROCESOS		PRODUCTO CON VALOR AGREGADO OBTENIDO
1.	Maní crudo	
2.	Selección y limpieza	
3.	Tostado	
4.	Enfriamiento	→ maní con cáscara
5.	Descascarado y limpieza	→ maní pelado tostado
6.	Escaldado	
7.	Mezclado	
8.	Molienda	
9.	Envasado	
10.	Pasteurizado	
11.	Enfriamiento	
12.	Almacenamiento	→ pasta de maní

Fuente: Adaptado de <https://www.fao.org/3/au171s/au171s.pdf>

Descripción del proceso

1. Seleccionar maní limpio, sano y maduro.
2. Eliminar basuras, piedras y maní en mal estado.
3. Tostar en tostador rotatorio a una temperatura entre los 140 y los 150 °C por un tiempo de 45 a 60 minutos.
4. Enfriar hasta la temperatura ambiente.
5. Eliminar la cáscara y las cubiertas utilizando equipo adecuado de descascarado y aire. Muchas veces el maní se descascara antes y posteriormente se tuesta.
6. Someter el maní tostado y limpio a un tratamiento térmico que consiste en una inmersión en agua hirviendo por 3 a 5 minutos. Después de este tiempo se saca y se deja escurrir.
7. Mezclar el maní con azúcar, sal y grasa hidrogenada o lecitina, en la siguiente proporción: 83-85 % maní; 12 % de azúcar; 0,15 ó 0,25 % sal; y 2,5 % de grasa.
8. Moler la mezcla en un molino de discos, debiéndose obtener un producto con consistencia cremosa y sabor definido.
9. Envasar en recipientes de vidrio o metálicos cerrados herméticamente.
10. Aplicar un tratamiento de pasteurización a 95 °C por 10 minutos, contados a partir de que el agua comienza a hervir.
11. Enfriar los envases hasta la temperatura ambiente. Para ello se colocan en otro recipiente con agua tibia (para evitar que el choque térmico quiebre los frascos) y luego se va agregando agua más fría hasta que los envases alcancen la temperatura ambiental.
12. Almacenar a temperatura ambiente en lugares ventilados y alejado de la luz. Si se almacena en refrigeración (3-4°C) la mantequilla de maní es estable a la rancidez por más de 2 años.

La industria alimenticia para obtener **maní crocante (Tabla 3)**, **recubierto con chocolate (Tabla 4)** y **confitado (Tabla 5)**, lleva a cabo las etapas generales que se detallan a continuación:

Tabla 3: Procesamiento para la obtención de maní crocante

ETAPAS DE LOS PROCESOS	PRODUCTO CON VALOR AGREGADO OBTENIDO
1. Maní pelado tostado	
2. Mezclado	
3. Cocción	
4. Enfriado	
5. Envasado	 maní crocante

Fuente: Adaptado de <https://es.wikihow.com/tostar-man%C3%AD>

Descripción del proceso

1. Seleccionar maní pelado tostado.
2. Mezclar el maní con harina de trigo, azúcar rubia, canela, sal, pimienta de cayena, ajo en polvo y pimentón ahumado.
3. Cocinar en horno a una temperatura entre los 140 y los 150 °C por un tiempo de 30 minutos.
4. Enfriar hasta la temperatura ambiente.
5. Envasar en bolsas de polietileno.

Tabla 4: Procesamiento para la obtención de maní recubierto con chocolate

ETAPAS DE LOS PROCESOS	PRODUCTO CON VALOR AGREGADO OBTENIDO
1. Maní pelado tostado	
2. Baño	
3. Enfriado y envasado	 maní recubierto con chocolate

Fuente: Adaptado de <https://www.recetavenezolana.com/mani-cubierto-de-chocolate/>

Descripción del proceso

1. Seleccionar maní pelado tostado.
2. Aplicar el baño de repostería sobre los maníes.
3. Enfriar y envasar en bolsas de polietileno.

Tabla 5: Procesamiento para la obtención de maní confitado

ETAPAS DE LOS PROCESOS	PRODUCTO CON VALOR AGREGADO OBTENIDO
1. Maní pelado tostado	
2. Mezclado	
3. Cocción	
4. Enfriado	
5. Envasado	 maní confitado

Fuente: Adaptado de <https://es.scribd.com/doc/184818861/Mani-Confitado>

Descripción del proceso

1. Seleccionar maní pelado tostado.
2. Agregar agua y azúcar junto con el maní.
3. Cocinar en una cuba a fuego lento hasta que se cristalice el azúcar.
4. Enfriar hasta la temperatura ambiente.
5. Envasar en bolsas de polietileno.

Existen otras formas de consumo gourmet de menor producción comercial como, por ejemplo: harina de maní, etc.

Maní Industria: Es el remanente que no fue seleccionado para maní tipo confitería.

1.5. Importancia de la determinación del contenido de fitoesteroles en las semillas de maní

Los fitoesteroles son compuestos que se encuentran de forma natural en alimentos de origen vegetal, los fitoesteroles que se encuentran en mayor proporción son el beta-sitosterol, el campesterol y el estigmasterol. Poseen una estructura muy similar a la del colesterol, este parecido hace que cuando ambas moléculas sean ingeridas, nuestro cuerpo priorice la utilización de los fitoesteroles sobre la del colesterol, lo cual favorece la reducción de los niveles de colesterol malo (LDL) sin alterar los valores de colesterol bueno (HDL).

Los fitoesteroles no se almacenan en el cuerpo, esto quiere decir que actúan en el momento en el que son consumidos para luego pasar a formar parte de las deposiciones. Por tal motivo se recomienda consumir estos alimentos durante o después de las comidas más importantes para reducir los niveles de colesterol en sangre. De esta forma, el colesterol proveniente del plato de comida competirá con los fitoesteroles, provenientes de alimentos ricos en esta sustancia, y se podrá obtener el efecto deseado (ANMAT, 2014).

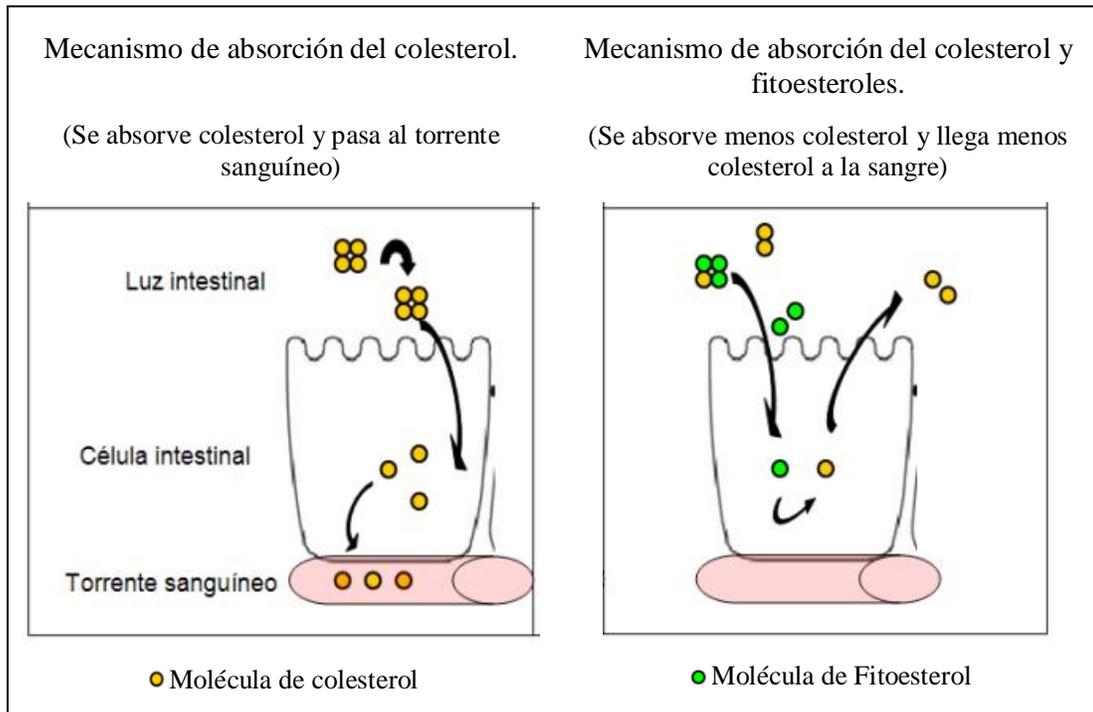
Para lograr reducir el colesterol no basta solo con consumir alimentos ricos en fitoesteroles, sino que es necesario mantener un estilo de vida saludable, realizando actividad física y alimentándose de forma equilibrada.

Según CONAL (2021) ingestas diarias de 1g a 3g de fitoesteroles han demostrado reducir la absorción del colesterol. Estos esteroides consumidos por personas sanas ayudan a mejorar el funcionamiento del organismo, no está indicado para curar enfermedades.

Según Alimentos Argentinos (2014), el colesterol es asimilado por nuestro organismo a través de micelas compuesta por el colesterol y otros lípidos, luego el intestino lo absorbe. Si el colesterol no forma parte de esas micelas, el intestino no puede absorberlo. Los fitoesteroles al ser parecidos al colesterol toman su lugar dentro de la micela, de esta forma el colesterol no puede formar parte de la micela y queda libre. Consecuentemente no puede ser absorbido por las células del intestino y termina siendo eliminado en las deposiciones.

La micela compuesta por los fitoesteroles al llegar a las células del intestino es absorbida de forma muy escasa, los restantes fitoesteroles también son excretados en las deposiciones. Otro beneficio adicional de los fitoesteroles absorbidos es que generan en la célula del intestino que la pequeña fracción de colesterol que ingresó en ella, o estaba de manera endógena en la célula intestinal, no pueda ingresar a la sangre porque estimula el reflujo hacia la luz del intestino. El colesterol que se encuentra en la luz intestinal, al no formar parte de micelas, se elimina en las heces (**Figura9**) (Alimentos Argentinos, 2014).

Figura 9: Mecanismo de absorción del colesterol y fitoesteroles en el organismo



Fuente: Alimentos Argentinos (2014).

Actualmente, en nuestro país la cadena agroindustrial de legumbres se compone de diversos actores, el productor agrícola, la industria alimenticia y otros organismos entre los que podemos mencionar las Universidades, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), etc. Estos organismos de investigación estudian las problemáticas de los sectores de producción e industrialización y les ofrecen soluciones a eventuales problemas.

El INTA trabaja en diferentes aspectos como el mejoramiento genético, la conservación, caracterización y mejoramiento de distintas legumbres, entre ellas el maní para su utilización como granos tales como el maní tipo confitería para consumo humano directo o a partir de sus componentes como ingredientes en la elaboración de nuevos alimentos. Por ello, podemos decir que se trabaja en la producción de materias primas con características específicas para su uso, de allí la importancia de contar con técnicas de laboratorio que determinen con precisión los componentes de los granos cultivados en el país.

En el Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua (LCASyA) de la EEA INTA Pergamino, en virtud de la demanda de los proyectos de investigación INTA; se trabajó en la implementación de un método para la identificación y cuantificación de fitoesteroles en semillas de maní por cromatografía gaseosa, dado que no se disponía de una técnica específica para ello. Por otro lado, cabe destacar que se consultó con otros laboratorios del país y se concluyó que no se realizaba esta metodología.

1.6. Técnica de cromatografía gaseosa para identificación y cuantificación de fitoesteroles en semillas de maní

Conocer la composición de las materias primas es de sumo interés para el sector agroalimentario, por ello la importancia de utilizar técnicas de cuantificación precisas para lograr productos terminados de la mejor calidad nutricional.

La cromatografía gaseosa (CG) es una técnica empleada para separar físicamente sustancias presentes en mezclas complejas de compuestos fácilmente volatilizables. La técnica comienza cuando la muestra se inyecta y es volatilizada en el inyector, luego se introduce en la columna capilar por la cual fluye la fase móvil o llamado *carrier*, generalmente helio; mientras que los distintos componentes de la muestra quedan fijados por su afinidad a la fase estacionaria de la columna.

La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de elución de cada componente, es decir el tiempo de retención en la columna; será función de su afinidad entre la fase móvil y la fase estacionaria; la temperatura y la velocidad del *carrier*. Cada soluto en la muestra tiene diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación. Los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente.

Posteriormente el equipo utilizando el detector va registrando la salida de cada compuesto a través de una señal emitida. Así se obtiene una sucesión de puntos que crea una línea y se forma una imagen en dos planos llamado cromatograma.

Un detector que puede utilizarse es el detector de llama o el espectrómetro de masa. En el caso de la espectrometría de masa o *Mass Spectrometry* (MS) se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, que una vez obtenidos se separan de acuerdo a su masa y su carga. Finalmente, los iones cargados son detectados por medio de un dispositivo adecuado, obteniéndose un patrón de masas específica y única para cada compuesto.

Por lo tanto, la combinación de las dos técnicas CG-MS permite la separación e identificación de mezclas complejas.

1.7. Validación metodológica

La validación consiste en confirmar y documentar que los resultados de la aplicación de un método de análisis son confiables. Este proceso resulta fundamental para el control de calidad e inocuidad de los alimentos. Para asegurar que un método es confiable se realiza una validación.

Todo método nuevo o modificado debe validarse previamente para poder introducirlo a la rutina y tener la seguridad de que los resultados emitidos serán los correctos, permite a los analistas demostrar que el método es adecuado para su propósito.

En la validación de un método está implícito que los equipos se utilizan según las especificaciones del fabricante, con funcionamiento y calibración correcta. Además, el operador que realiza los estudios debe estar capacitado para ese tipo de trabajo, con el fin de que sea capaz de tomar decisiones idóneas.

1.8. Criterios de validación. Definiciones

Los requisitos o criterios de validación que debe cumplir un método analítico y que deben ser determinados en el procedimiento de validación son los siguientes:

- 1) Exactitud (Veracidad o Justeza y Precisión)
- 2) Selectividad
- 3) Linealidad
- 4) Sensibilidad de calibrado
- 5) Límite de detección y límite de cuantificación
- 6) Robustez

1) La exactitud es la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen. Es la concordancia entre la mejor estimación de una cantidad y su valor real.

La exactitud puede estudiarse en dos componentes: la veracidad y la precisión. De hecho, la exactitud es un concepto cualitativo y no es posible medirlo sino a través de los componentes mencionados.

La veracidad o justeza de un método es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto de un valor real, se evalúa mediante el sesgo. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores que deberían corregirse.

La veracidad puede ser determinada calculando el sesgo o el porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra.

Para determinar el sesgo debe utilizarse material de referencia o material de ensayo de aptitud.

El porcentaje de recuperación consiste en fortificar la muestra antes del análisis, realizar el proceso analítico de muestra fortificada y muestra sin fortificar, luego se realiza el cálculo de la diferencia de los valores obtenidos analíticamente. Este valor permite conocer la eficiencia del método para cuantificar el analito en estudio.

Otra manera de determinar el sesgo es utilizando curva de calibración externa y un analito de concentración conocida. Esto fue lo empleado en este trabajo.

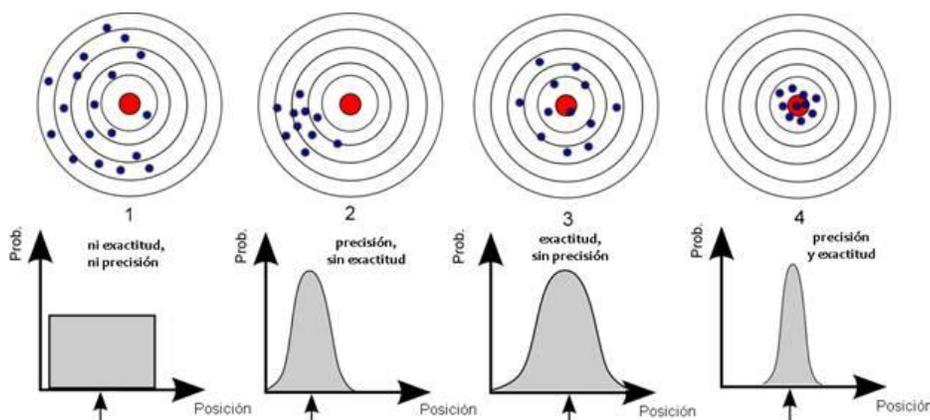
La precisión se determina haciendo ensayos repetitivos de una misma muestra, o de cada conjunto de muestras (siendo muy importante la homogeneidad del sustrato). La precisión se evalúa en dos niveles: la repetibilidad y la reproducibilidad.

La repetibilidad es la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (un solo operador, el mismo equipo, los mismos reactivos, el mismo día, etc.). Se lleva a cabo sobre la base de un número suficiente de determinaciones de una mezcla homogénea del producto. Los ensayos en este contexto son los análisis independientes de muestras que han pasado por todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta los resultados de las pruebas finales. La repetibilidad describe la variabilidad mínima del proceso analítico.

La reproducibilidad es la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones (en diferentes días, por diferentes personas, empleando reactivos preparados de diferentes lotes, etc.). La reproducibilidad describe la máxima variabilidad de un procedimiento analítico.

La precisión se calcula matemáticamente a través del coeficiente de variación (CV) o también llamado variabilidad. Un método será más preciso, en tanto menor coeficiente de variación se obtenga, es decir, cuanto más se acerquen entre sí los resultados obtenidos de varios análisis realizados a una misma muestra. Rivero (2013) utiliza la **figura 10** para graficar las posibles situaciones que pueden existir al comparar exactitud y precisión de un método analítico. El caso uno grafica un método de escasa exactitud y escasa precisión, el caso dos un método de buena precisión y escasa exactitud, el caso tres un método de buena exactitud y escasa precisión, el caso cuatro un método de buena exactitud y buena precisión.

Figura 10: Comparación de la exactitud y la precisión de un método analítico



Fuente Rivero (2013).

2) La selectividad o especificidad se define como la habilidad de un método para responder exclusivamente a la sustancia que se desea analizar.

3) Linealidad es la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta del método en un intervalo o rango de concentraciones.

4) La sensibilidad de calibrado se define como el coeficiente diferencial entre la señal medida (respuesta del método) y la concentración del analito:

En el caso de una calibración lineal, la sensibilidad de calibrado coincide con la pendiente de la recta de calibración, e indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones de la concentración del analito.

5) Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Es variable cualitativa.

El límite de cuantificación es la menor concentración o cantidad de analito que puede ser cuantificada con aceptable precisión y exactitud. Es variable cuantitativa.

6) Robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. Los factores de influencia pueden ser cuantitativos (pH, temperatura, porcentaje de componente orgánico en una fase móvil, etc.) como cualitativos (fabricante de una columna, de un reactivo, etc.) (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010; Vinagre, 1995).

1.9. Antecedentes

Zhouet *et al.* (2018) realizó estudios de identificación y cuantificación de fitoesteroles en semillas de maní, concluyendo que los valores obtenidos son consistentes con los datos bibliográficos existentes.

1.10. Hipótesis

La metodología desarrollada por cromatografía gaseosa acoplado a un detector de espectrometría de masas (CG-MS) es de utilidad, en términos analíticos de laboratorio, para identificar y cuantificar fitoesteroles en granos de maní.

1. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar una metodología para identificar y cuantificar fitoesteroles en maní por cromatografía gaseosa.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la repetibilidad del método para evaluar la mínima variabilidad del procedimiento analítico.

Determinar la reproducibilidad del método para evaluar la máxima variabilidad del procedimiento analítico.

Determinar el sesgo para evaluar la veracidad del método en estudio.

2. METODOLOGÍA

3.1. Material utilizado

Se utilizó una muestra representativa de semillas de maní de la variedad Runner cosechadas en madurez fisiológica en la provincia de Córdoba. La muestra contenía 47 % de materia grasa en base seca.

3.2. Metodología

Para esta tesis se empleó la técnica de Zhou *et al.* (2018) publicada en el sitio National Library of Medicine de los EE. UU.

3.2.1. Instrumental y elementos de laboratorio

- Cromatógrafo gaseoso marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500 con detector de masa SQ8 e inyector PSS (**Figura 11**).
- Molino de cuchillas planas refrigerado *HQ Analyzer MC-II*.
- Balanza analítica con una exactitud de 0,0001 g.
- Baño seco marca Labnet, modelo AccuBlock; con pozos de 12 mm de diámetro interno para asegurar condiciones estables de temperatura durante la saponificación (80°C durante 2 hs).
- Centrifuga marca Gelec, modelo G142.
- Vortex.
- Pipetas, tips, espátulas, etc.
- Matraces aforados de 5 ml.
- Tubos de vidrio para realizar la saponificación de 10 mm de diámetro externo, viales de 2 ml con sus tapas para cromatografía gaseosa.

Figura 11: Cromatógrafo gaseoso marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500 con detector de masa SQ8 e inyector PSS



3.2.2. Drogas y Reactivos

- Agua destilada para análisis (p.a.)
- Hidróxido de potasio marca Cicarelli, (KOH) = 10%
Disolver 50 g de KOH en 50 ml de agua desionizada y llevar a volumen de 500 ml con metanol.
- Metanol de grado HPLC marca Biopack.
- N- hexano de grado HPLC marca Cicarelli.
- Acetona de grado HPLC marca Biopack.
- Piridina anhídrida (99 % de pureza) marca Cicarelli.
- BSTFA (99 % de pureza) marca AccuStandard.
- 5alfa-cholestan-3beta-ol (97 % de pureza) marca Merck. Preparar una solución de 1 mg de 5alfa-cholestan-3beta-ol en 1 ml de n-hexano para utilizar como estándar interno (EI). La finalidad de utilización del EI es cuantificar las pérdidas de los fitoesteroles durante la aplicación del procedimiento técnico.
- Estigmasterol (95 % de pureza) marca Sigma.
- Beta-sitosterol (95 % de pureza) marca Sigma.

3.2.3. Procedimiento técnico

1. Acondicionar la muestra retirando vainas, palos y otras partes de la planta que no sean los granos de maní dejando las pieles.
2. Pesar 25 g de maní acondicionado y secar en un horno de aire forzado a 130 °C durante 45 minutos.
3. Moler en molino refrigerado 15 segundos.
4. Pesar 50 mg de la muestra molida y colocar en el tubo de vidrio apto para la saponificación.
5. Agregar 25 ul de solución de estándar interno (1mg/1ml).
6. Agregar 1 ml de solución de KOH/MeOH al 10%.
7. Saponificación: colocar el tubo de vidrio que contiene la muestra y los reactivos en el baño seco a 80°C durante 2hs, con agitación cada 10 minutos.
8. Cumplida las 2 hs se retira del baño y dejar enfriar a temperatura ambiente.
9. Agregar 1ml de n-hexano al tubo de vidrio para extraer la fracción no saponificable que contenía los fitoesteres.
10. Agitar en Vortex durante 10 segundos y centrifugar a 3300 rpm por 10 minutos.
11. Transferir la capa de n-hexano a un vial de 2 ml.
12. Eliminar el n-hexano por evaporación en una campana extractora usando una contracorriente de N₂.
13. Al residuo seco agregar 20 ul de acetona para disolver los esterles.
14. Solvatación: agregar 10 ul de BSTFA (silanzante) y 10 ul de piridina (catalizador).
15. Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes del análisis cromatográfico.
16. Inyectar 1 ul en el equipo CG-MS.

3.2.4. Análisis CG-MS

Se inyectaron 1 μ l de mezcla de derivatización en un GC-MS Perkin Elmer (Clarus 500 acoplado con detector de masa SQ8 e inyector PSS) El GC estaba equipado con una columna capilar Agilent Elite-5 Ms de calibre estrecho (30 m \times 0,25 mm ID \times 0,25 μ m df). El modo de inyección fue splitless, con gas portador helio a un flujo constante de 1 ml / min. El horno GC se puso a 180 $^{\circ}$ C se mantuvo durante 3 min, luego la temperatura se aumentó a 275 $^{\circ}$ C a 8 $^{\circ}$ C/min y se mantuvo a 275 $^{\circ}$ C durante 16,40 min.

Los datos de GC/MS se procesaron con el software TurboMass (versión 6.1.0.1963). Los picos de fitoesteroides se identificaron comparando con los espectros de masas de la base de datos (NIST, 2023).

3.3. Puesta en marcha de la metodología en el LCASyA

3.3.1. Acondicionamiento

Para la puesta en marcha de esta metodología fue necesario el acondicionamiento de los elementos e instrumental del laboratorio, la preparación de los reactivos, la preparación de las planillas de trabajo, y se protocolizó cómo realizar una adecuada eliminación de los residuos.

3.3.2. Ejecución del método

En esta etapa se ejecutó el procedimiento técnico reiterada veces con el objetivo de comprobar si los resultados obtenidos coincidían con datos bibliográficos.

3.3.3. Verificación del método

Se procedió a verificar la calidad de los resultados, para ello se evaluó la exactitud del método. Se estudió la exactitud del método en sus dos componentes: la precisión y la veracidad.

La precisión se evaluó mediante la repetibilidad y reproducibilidad.

3.3.3.1. Determinación de la repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad del método se realizaron diez determinaciones de una misma muestra (material de estudio), en el mismo día, por el mismo analista, se utilizó el mismo equipamiento y se mantuvieron iguales las condiciones ambientales y de operación. La repetibilidad se calculó utilizando el coeficiente de variación.

3.3.3.2. Determinación de la reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad del método se realizaron diez determinaciones de la misma muestra (material de estudio) en diferentes días, diferentes analistas y diferentes reactivos. Se utilizó el mismo equipamiento y se mantuvieron iguales las condiciones ambientales y de operación. Para determinar la reproducibilidad se calculó el coeficiente de variación.

3.3.3.3. Determinación de la veracidad

La veracidad es la concordancia entre un valor promedio de determinaciones realizadas y el valor teórico, se evaluó mediante el método de sesgo (Álvarez, 2007).

Para realizar el método de sesgo se procedió de la siguiente manera:

- Se realizó una curva de calibración con estándares externos y se verificó el coeficiente de determinación (R cuadrado) siendo no menor del 0,98.
- Se procedió a cuantificar seis veces el punto medio de la curva y se realizó el cálculo del sesgo, utilizando la fórmula siguiente:

$$S = (x - x_a)$$

S: sesgo.

X: valor promedio de las lecturas obtenidas.

Xa: valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

Para evaluar el comportamiento del método en estudio respecto al sesgo obtenido, se aplicó el test de Student para comparación de pares de medidas, utilizando el método sesgo al para $n = 6$.

Para calcular el test de Student se necesitó el t calculado y t crítico.

t crítico se obtuvo de tablas y el t calculado se obtuvo según fórmula siguiente:

$$t_{\text{calc}} = \frac{[x - x_a]}{s * \sqrt{\frac{1}{n}}}$$

Dónde:

t_{calc} = t observado o calculado.

X: valor promedio de las lecturas obtenidas.

X_a: valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

S= desviación estándar de las lecturas.

n= número de lecturas

El trabajo se desarrolló en las instalaciones del sector Laboratorios de la EEA INTA Pergamino.

3.3.3.4. Identificación de los compuestos

Cada compuesto se identificó comparando el espectro de masa específico con los espectros de la biblioteca NIST (2023) que fue instalada en el equipo.

3.3.3.5. Cuantificación de los compuestos

Para llevar a cabo la cuantificación de los fitoesteroles en estudio se debe realizar una curva de calibración con estándares externos de 5alfa-cholestan-3beta-ol, estigmasterol y beta-sitosterol. Se acepta un coeficiente de determinación (R cuadrado) mayor de 0,98.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Puesta en marcha de la metodología

A partir de ejecutar reiteradamente la técnica, se optó por la rutina de trabajo que a continuación se detalla:

Día uno:

- Realizar el procedimiento técnico que se describe en el apartado 3.2.4.2.
- El protocolo de limpieza y descarte de desecho de los análisis se detallan a continuación:

Procedimiento para la eliminación de desechos sólidos.

Los desechos sólidos provienen de los sedimentos de los tubos de centrifuga, que se remueven utilizando una espátula y los viales luego de su inyección en el cromatógrafo. Estos desechos se descartan en recipientes con bolsas especiales precintadas debidamente rotulados "Sólidos" provistos por la empresa contratada.

Procedimiento para la eliminación de desechos líquidos.

1. Se descartan los líquidos sobrantes contenidos en tubos de centrifuga en recipientes estancos debidamente rotulados como "Líquidos ácido/base" provistos por la empresa contratada. Luego se enjuagan los tubos de centrifuga con agua de canilla y se descarta este primer enjuague en el recipiente rotulado "Líquidos ácido/base".
2. Posteriormente se lavan los tubos de centrifuga con agua jabonosa, con ayuda de cepillos y sonicador. Luego se realiza varios enjuagues con agua de canilla y el último con agua destilada descartando los líquidos en el desagüe domiciliario del laboratorio.
3. Se colocan los recipientes lavados en gradillas correspondientes y se llevan a estufa con una temperatura de 30°C para su secado.
4. Todos los viales conteniendo n-hexano del sector instrumental del laboratorio son descartados en el recipiente estanco de solventes orgánicos.

Los residuos sólidos y líquidos producidos por el LCASyA son recolectados por la empresa contratista, encargada del traslado de residuos y disposición final de los residuos.

Día dos:

- Encender el CG-MS y esperar el tiempo necesario hasta que los parámetros se estabilicen.
- Realizar la curva de calibración y verificar el coeficiente de determinación (R cuadrado).
- Inyectar las muestras en el CG-MS.
- Eliminar los residuos según protocolo.

4.2. Verificación del método**4.2.1. Resultados y discusión de la prueba de repetibilidad**

En la **Tabla 6** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de repetibilidad

Tabla 6: Ensayos involucrados en el análisis de repetibilidad.

Muestra	Estigmasterol	Beta-Sitosterol
Ensayo 1	2,46	21,55
Ensayo 2	1,57	20,34
Ensayo 3	1,21	23,22
Ensayo 4	1,60	22,40
Ensayo 5	1,64	22,21
Ensayo 6	1,10	19,90
Ensayo 7	1,12	19,82
Ensayo 8	1,90	20,21
Ensayo 9	2,01	21,29
Ensayo 10	1,95	22,50
<i>Promedio</i>	1,66	21,34
<i>Desvío estándar</i>	0,44	1,22
<i>CV</i>	0,26	0,06

El coeficiente de variación (CV) fue de 0,26 para estigmasterol y 0,06 para beta-sitosterol, este valor corresponde a la mínima variabilidad entre las determinaciones.

4.2.2. Resultados y discusión de la prueba de reproducibilidad

En la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de reproducibilidad

Tabla 7: Ensayos involucrados en el análisis de reproducibilidad.

Muestra	Estigmasterol	Beta-Sitosterol
Ensayo 1	1,67	22,50
Ensayo 2	1,65	22,18
Ensayo 3	1,07	19,95
Ensayo 4	1,16	19,88
Ensayo 5	1,66	22,56
Ensayo 6	1,97	22,35
Ensayo 7	2,46	21,55
Ensayo 8	1,57	20,34
Ensayo 9	1,21	23,22
Ensayo 10	2,57	20,62
<i>Promedio</i>	1,70	21,52
<i>Desvío estándar</i>	0,51	1,22
<i>CV</i>	0,30	0,06

El coeficiente de variación (CV) fue de 0,30 para estigmasterol y 0,06 para beta-sitosterol, este valor corresponde a la máxima variabilidad del procedimiento analítico.

4.2.3. Resultados y discusión de la prueba de veracidad

En la **Tabla 8** se muestran los resultados del método sesgo obtenido para seis ensayos. Por último, se realizó una prueba del test de Student para evaluar las diferencias estadísticas del método.

Tabla 8: Ensayos involucrados en el método de sesgo

Muestra	Resultado (ppm)		Sesgo	
	Estigmasterol	Beta-Sitosterol	Estigmasterol	Beta-Sitosterol
Ensayo 1	4,30	38,70	0,3	1,3
Ensayo 2	4,40	38,90	0,4	1,1
Ensayo 3	4,60	40,60	0,6	0,6
Ensayo 4	3,83	37,47	0,2	2,5
Ensayo 5	3,92	36,49	0,1	3,5
Ensayo 6	4,68	43,79	0,7	3,8
Promedio	4,29	39,31	0,29	0,69
D. estándar	0,36	2,59	0,36	2,59
n	6	6		

Para el cálculo de t de Student, el t crítico se obtuvo de tabla (Anexo-**Tabla 9**) y para el t calculado se utilizó la formula siguiente:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{[x - x_a]}{s * \sqrt{n}}$$

Con los datos obtenidos y de tabla se realizó una prueba t de Student para los compuestos en estudio.

Se calculó el t Student para el compuesto estigmasterol:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{[0,29 - 0,36]}{0,36 * \sqrt{6}} = \mathbf{0,327}$$

t crítico = **2,571**

Para conocer si existen diferencias entre el valor de la experiencia analítica y el valor de referencia, se determinó el t calculado (0,327) el cual fue menor que el t crítico (2,571); por lo tanto, esto indica que no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos para el 95 % de confianza y 5 grados de libertad.

Se calculó el t Student para el compuesto beta-sitosterol:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{[0,69 - 0,69]}{2,59 * \sqrt{6}} = \mathbf{0,109}$$

t crítico = **2,571**

Para conocer si existen diferencias entre el valor de la experiencia analítica y el valor de referencia, se determinó el t calculado (0,109) el cual fue menor que el t crítico (2,571); por lo tanto, esto indica que no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos para el 95 % de confianza y 5 grados de libertad.

De este modo se concluye que, la metodología utilizada para la identificación y cuantificación de estos fitoesteroles en maní tiene una veracidad aceptable.

4.2.4. Resultados y discusión de la prueba de identificación

Cada compuesto se identificó comparando el espectro de masa específico con los espectros de la biblioteca NIST (2023).

En la **figura 12** se muestra un compuesto que tiene un tiempo de retención o elución de 23,30 minutos. Al comparar con la biblioteca NIST (2023) este compuesto se identificó como **cholestanol** siendo un sinonimo de **5alfa-cholestan-3beta-ol**.

De igual manera para el compuesto que tiene un tiempo de retención o elución de 26,92 minutos, la biblioteca NIST (2023) lo identificó como **estigmasterol (figura 13)**.

Procediendo de igual manera con el compuesto que tiene un tiempo de retención o elución de 28,71 minutos, la biblioteca NIST (2023) lo identificó como **beta-sitosterol (figura 14)**.

Figura 12: Identificación del compuesto 5alfa-cholestan-3beta-ol

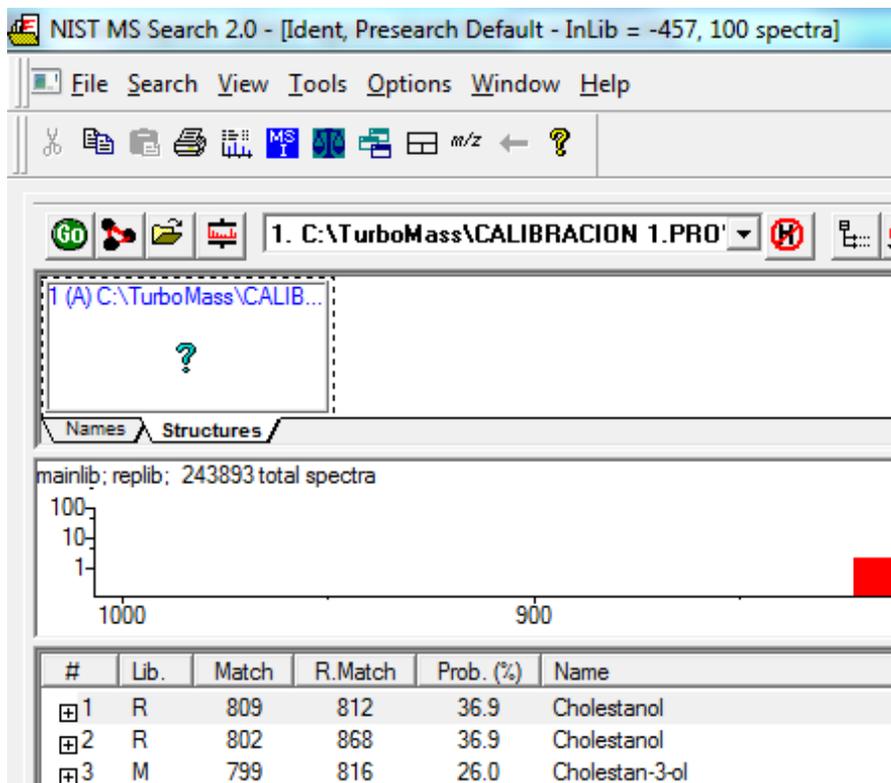
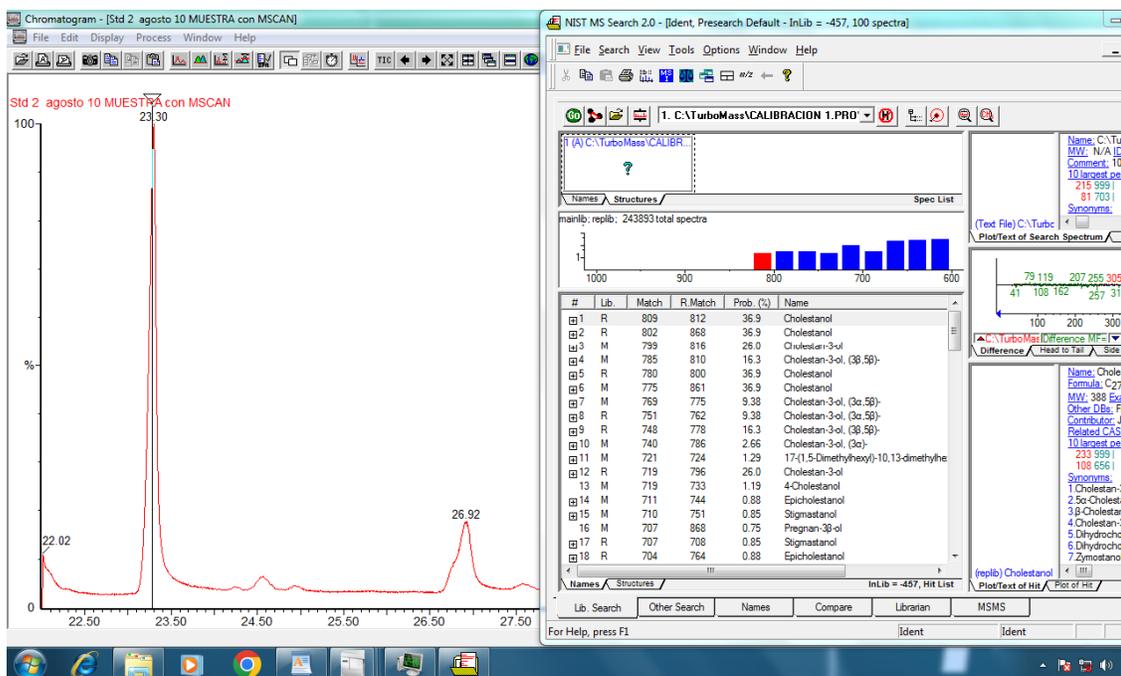


Figura 13: Identificación del compuesto estigmasterol

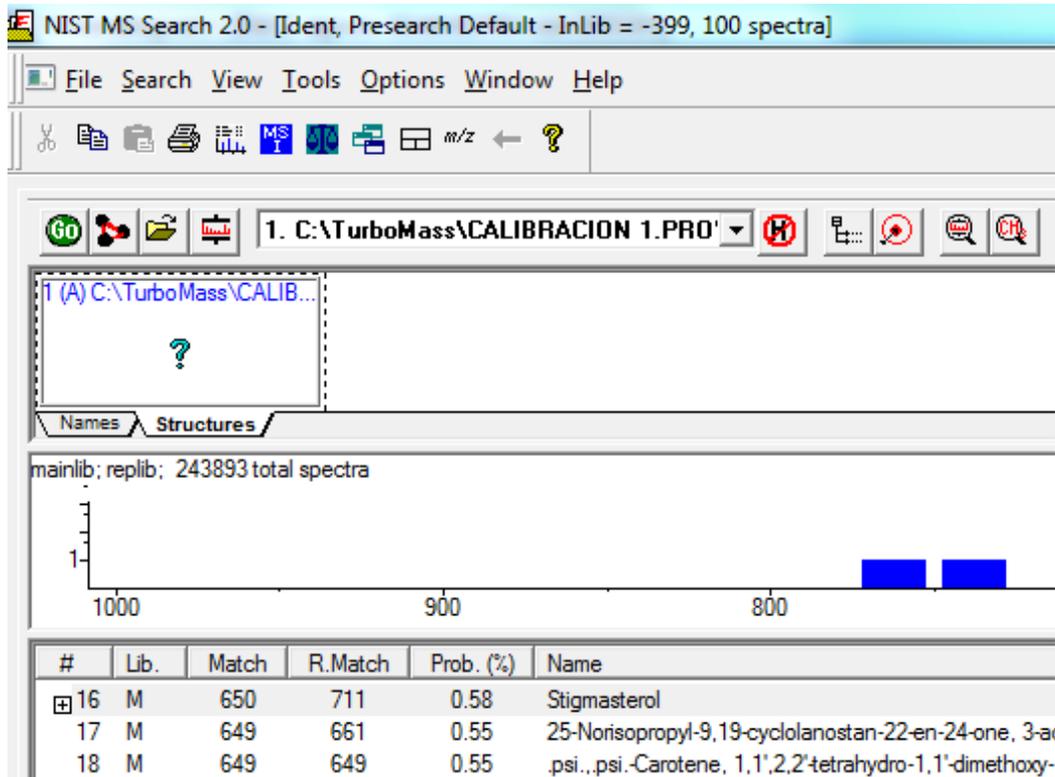
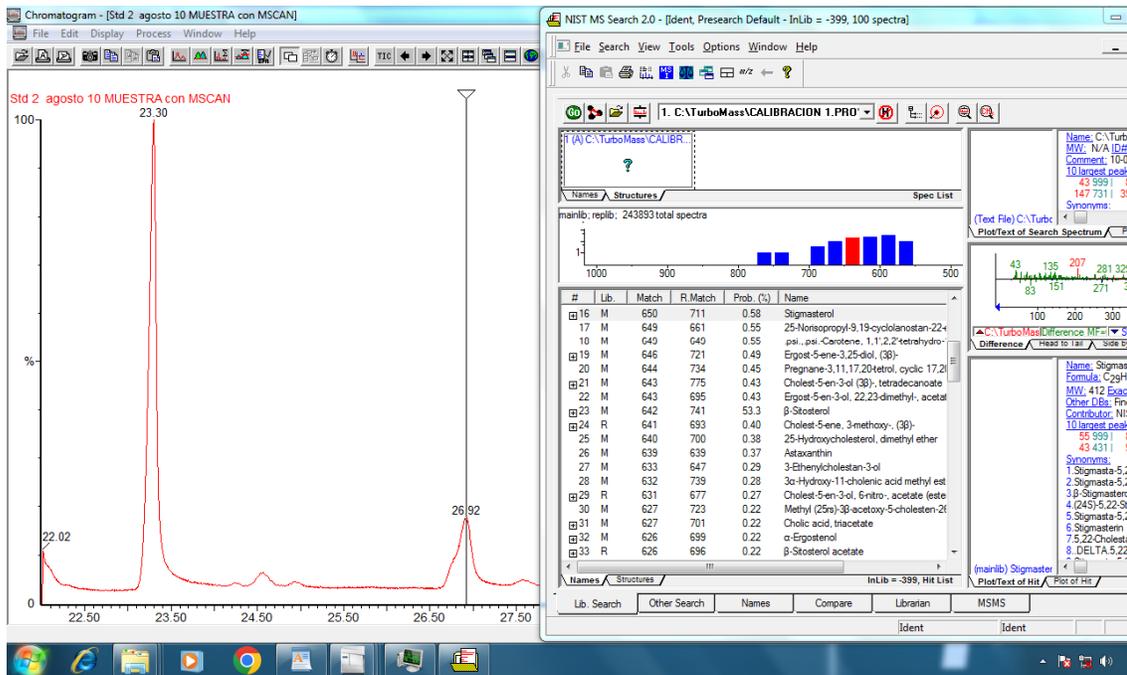
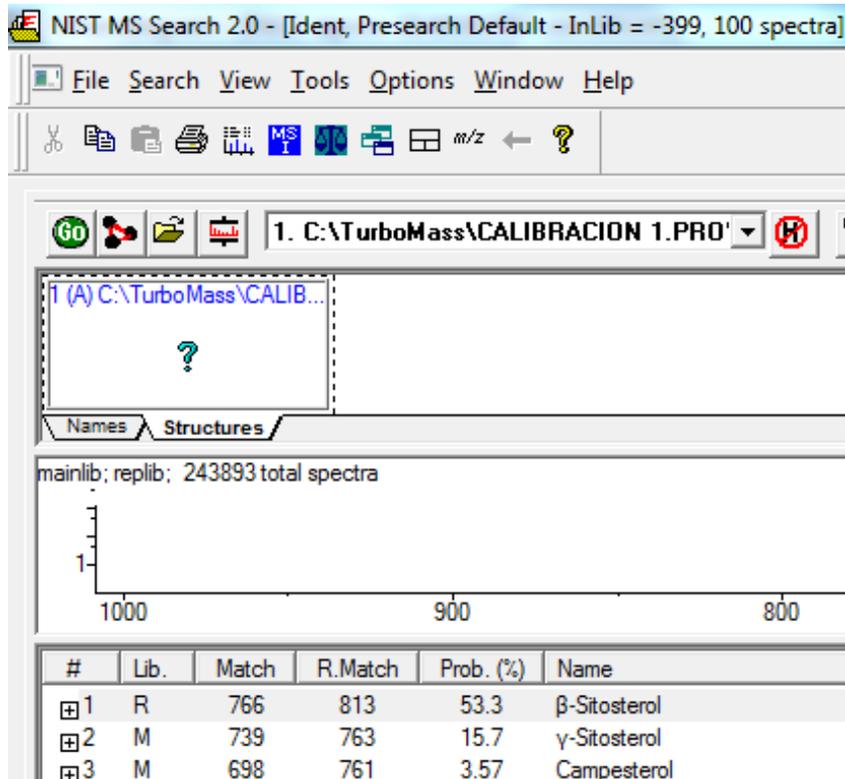
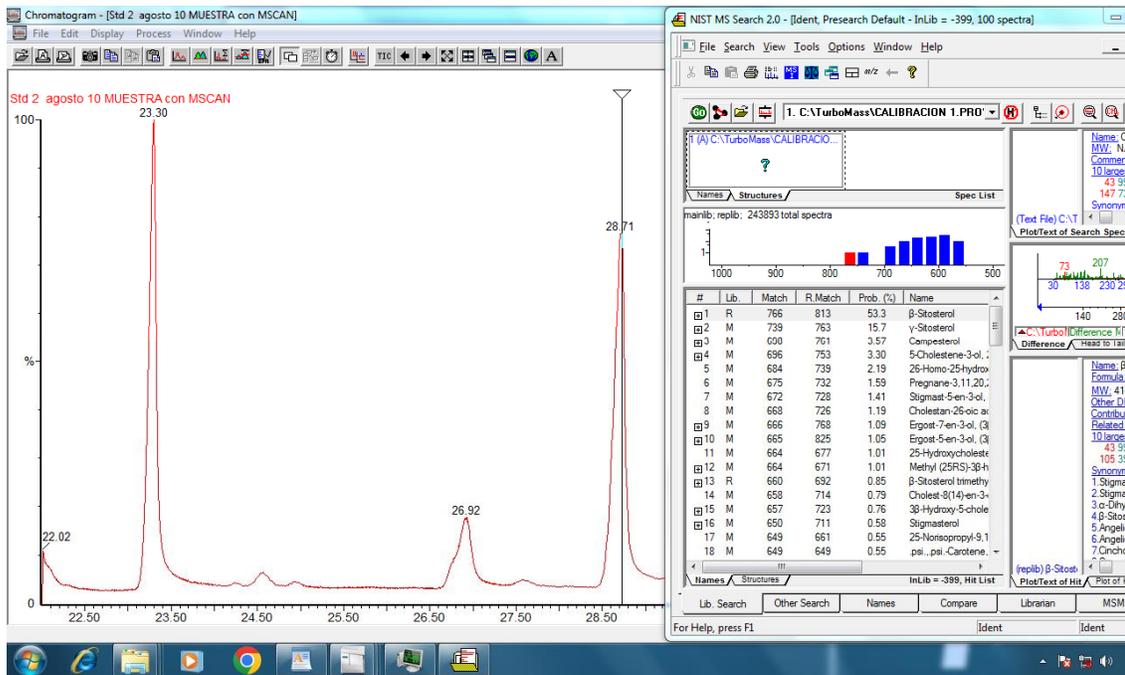


Figura 14: Identificación del compuesto beta-sitosterol



4.2.4. Resultados y discusión de la prueba de cuantificación

La concentración de fitoesteroles se obtuvo a partir del peso de las semillas de maní tostado en base seca y fueron 44,31 mg de beta-sitosterol y 3,39 mg para el estigmasterol por 100 g de semilla (Anexo-**Tabla 10**). Los resultados informados por Awad *et al.* (2009) fueron de 47,2 mg de beta-sitosterol y 7,7 mg para el estigmasterol por 100 g de semilla.

Se procedió al cálculo de t de Student para verificar si existían diferencias significativas entre los valores obtenidos en esta tesis y los datos bibliográficos. El t crítico se obtuvo de tabla (Anexo-**Tabla 11**) y para el t calculado se utilizó la formula siguiente:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{[x - x_a]}{s * \sqrt{n}}$$

Se calculó el t Student para el compuesto beta-sitosterol:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{[44,31 - 47,2]}{2,262 * \sqrt{5}} = 1,017$$

t crítico = **2,262**

Para el compuesto beta-sitosterol se determinó el t calculado (1,017) el cual fue menor que el t crítico (2,262); por lo tanto, esto indica que no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos para el 95 % de confianza y 5 grados de libertad.

Se calculó el t Student para el compuesto estigmasterol:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{[3,39 - 7,7]}{2,262 * \sqrt{5}} = 2,177$$

t crítico = **2,262**

Para el compuesto estigmasterol se determinó el t calculado (2,177) el cual fue menor que el t crítico (2,262); por lo tanto, esto indica que no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos para el 95 % de confianza y 5 grados de libertad.

Entonces podemos decir que al comparar los valores aquí obtenidos respecto a lo informado por Awad *et al.* (2009) no hay diferencias significativas para el beta-sitosterol y estigmasterol para las semillas de maní. Aunque los resultados ligeramente inferiores obtenidos en esta tesis pueden atribuirse a la variedad genética de la semilla utilizada y el ambiente donde fue cultivada.

Según FAO (2009) indica que la concentración de beta-sitosterol es de 90,06 mg a 131,1 mg por cada 100 g de aceite de maní en base seca (BS), para estigmasterol es de 10,26 mg a 25,08 mg por cada 100 g de aceite de maní en BS. Los valores obtenidos en esta tesis fueron 91,38 mg de beta-sitosterol y 7,21 mg para el estigmasterol por cada 100 g de aceite de maní en BS (Anexo-**Tabla 12**).

4. CONCLUSIÓN

La implementación de esta técnica CG-MS le permitió al LCASyA acceder a una metodología de identificación y cuantificación del contenido de beta-sitosterol y estigmasterol en maní que hasta el momento no existía.

En las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad los CV fueron valores esperados, por lo tanto, se dice que la variación del método entre las determinaciones es confiable.

Trabajando con un nivel de confianza del 95 % y 5 grados de libertad, se ha podido corroborar la hipótesis, concluyendo que no existen diferencias significativas al probar la veracidad del método.

5. REFERENCIAS

- A, Awad; K , Chan; A , Downie; C, Fink. (2009). Recuperado el 11 de 09 de 2023, de http://dx.doi.org/10.1207/S15327914NC3602_14
- AACC. (1995). *Approved Methods of the AACC*. 9th Edition, AACC. Inc.: St. Paul Minnessota.
- Alimentos Argentinos. (2013). Recuperado el 12 de 09 de 2023, de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/valorAr/Educa/Fic/Ficha_23_Fitoesteroles.pdf
- Alimentos Argentinos. (2014). Recuperado el 28 de 07 de 2023, de http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_31_Legumbres.pdf
- Álvarez, P. (2007). *Validación de métodos analíticos y control de calidad interno*. Pergamino, Argentina: INTA Pergamino.
- ANMAT. (2014). Fitoesteroles. Recuperado el 25 de 08 de 2022, de <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.anmat.gov.ar/alimentos/fitosteroles.pdf>
- Bolsa de Comercio de Rosario. (2019). Recuperado el 11 de 07 de 2023, de <https://www.bcr.com.ar/es/print/pdf/node/73324>
- Bolsa de Comercio de Rosario. (2021). Recuperado el 11 de 07 de 2023, de <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/un-nuevo>
- CAA. (2013). Capítulo XI, alimentos vegetales, artículo 859 - 897. Recuperado el 25 de 08 de 2023, de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_xi_vegetales_actualiz_202008.pdf
- Cámara Argentina del maní. (2023). *El maní, un super alimento para todas las edades*. Recuperado el 11 de 09 de 2023, de <https://camaradelmani.org.ar/superalimento/>
- CONAL. (2021). Recuperado el 02 de 08 de 2023, de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2019/02/directrices_suplementos_dietarios_2021.pdf
- De Bernardi. (2020). Recuperado el 11 de 07 de 2023, de https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/publicaciones/_archivos/000101_Perfiles/999980_Perfil%20del%20Garbanzo%202020.pdf
- FAO. (2009). Recuperado el 18 de 09 de 2023, de https://www.fao.org/input/download/standards/336/CXS_210s_2015.pdf
- FAO. (2016a). *FAO*. Recuperado el 11 de 07 de 2023, de <https://www.fao.org/3/i5384s/i5384s.pdf>

- FAO. (2016b). *FAO*. Recuperado el 11 de 07 de 2020, de <http://www.fao.org/3/i5528s/I5528S.pdf>
- FAO. (2023). Recuperado el 20 de 09 de 2023, de <http://faostat.fao.org/>
- Grosso, R. (2020). Recuperado el 28 de 07 de 2023, de <https://camaradelmani.org.ar/superalimento/>
- Institute for Nutraceutical Advancements. INA method 109.001. (2005). *Sterols content in Saw palmetto*.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos. Guía técnica N° 1.
- ISO 10520. (1997). Almidones y féculas nativos. Determinación del contenido de almidón, Método polarimétrico de Ewers. Obtenido de <https://www.iso.org/standard/18589.html>
- Jukanti, A., Gaur, P., Gowda, C., & Chibbar, R. (2012). *Nutritional quality and health benefits of chickpea (Cicer arietinum L.)*. Recuperado el 26 de 12 de 2022, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22916806/>
- Lagarda, M., Farré, R., & G., G.-L. (2006). Analysis of phytosterols in foods. España.
- Martinez, M., Silvia, M., Badini, R., Aguilar, R., Inga, M., Tomasoni, M., & Spahn, G. (2008). Recuperado el 27 de 07 de 2023, de <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2025/29-%20Martinez%20Maria%20Jose%20-%20Mani%20de%20Cordoba.pdf>
- Merino, J., Masana, L., Gujjarroc, C., Ascasod, J., Lagares, M., & Civeira, F. (2014). Recuperado el 03 de 08 de 2023, de <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-pdf-S0214916814000527>
- NIST. (2023). Recuperado el 14 de 09 de 2023, de <https://webbook.nist.gov>
- Peanut Institute. (2023). Recuperado el 28 de 07 de 2023, de <https://peanut-institute.com/wp-content/uploads/2023/03/Handout-Bioactivespdf.pdf>
- Rivero, j. (2013). Validación Métodos Analíticos Cuantitativos, Cualitativos y SemiCuantitativos en el Laboratorio Clínico.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2015). Leguminosas, el alimento de todos. Mexico. Recuperado el 15 de 06 de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/leguminosas-el-alimento-de-todos>
- SHIN, E., PEGG, R., PHILL, R., & EITENMILLER, R. (2010). Recuperado el 03 de 08 de 2023, de <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf102150n>
- SISA. (2021). *MANÍ . 2020 . 2021*. Recuperado el 11 de 07 de 2023, de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sisa_if_mani_20_21.pdf
- The Peanut Institute. (03 de 2019). The Peanut Institute. Recuperado el 21 de 12 de 2022, de <https://peanut--institute-com.translate.google.com/nutrition-research/peanut->

nutrients/bioactive-
compounds/?_x_tr_sl=auto&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=wapp

U.S. Department of Agriculture. (2009). Recuperado el 11 de 09 de 2023, de <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

Universidad Nacional de Río Cuarto. (2017). Recuperado el 11 de 07 de 2023, de https://www.produccionvegetalunrc.org/docs/ECMC_2.pdf

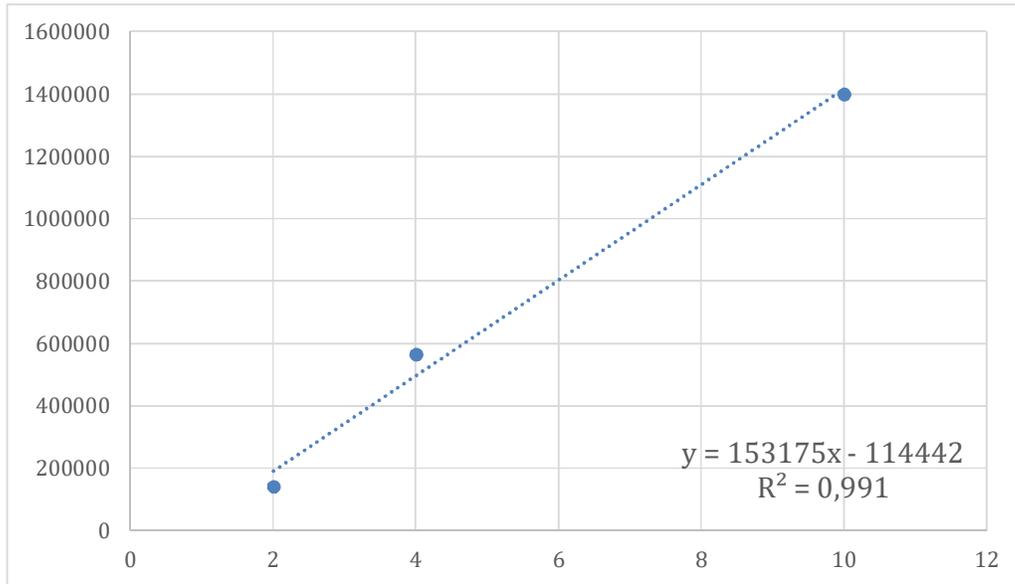
Vinagre, J. (1995). Calidad de métodos analíticos.

Zhou, W., Branch, W., Gilliam, L., & Marshall, J. (29 de 12 de 2018). Phytosterol Composition of *Arachis hypogaea* Seeds from Different Maturity Classes. Recuperado el 2023 de 01 de 03, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337221/>

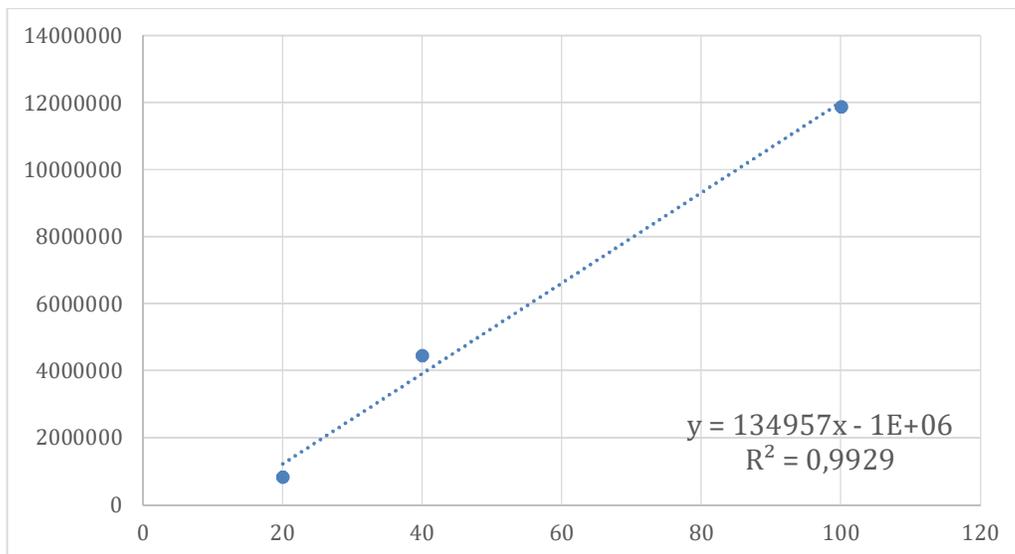
6. ANEXOS

7.1. Curvas de calibración utilizadas en este experimento

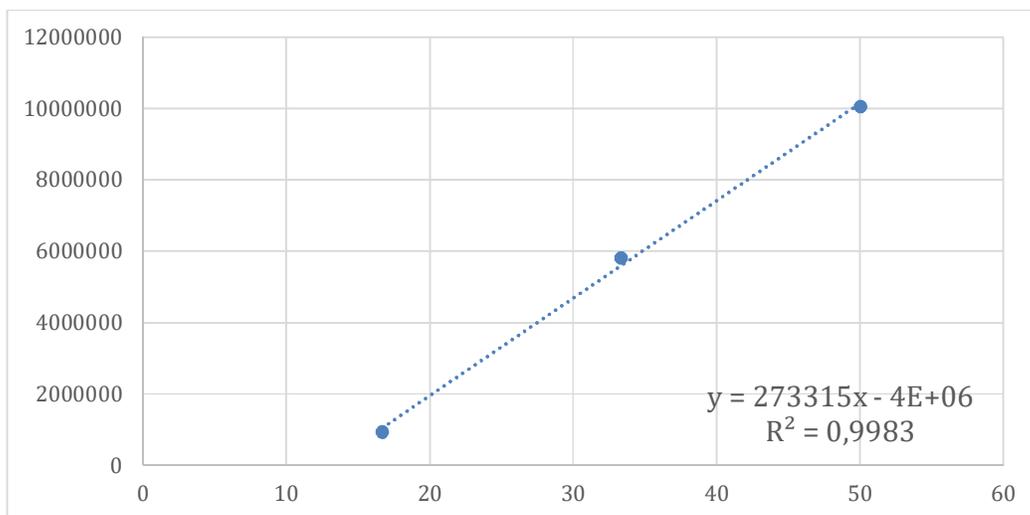
Compuesto: estigmasterol



Compuesto: beta-sitosterol



Compuesto: 5alfa-cholestan-3beta-ol, utilizado como estándar interno



7.2. Tablas utilizadas para el método estadístico test de Student

Tabla 9: t Student para método de sesgo

2 colas	80%	90%	95%
$\alpha/2$	0.10	0.05	0.025
v			
1	3.078	6.314	12.706
2	1.886	2.920	4.303
3	1.638	2.353	3.182
4	1.533	2.132	2.776
5	1.476	2.015	2.571
6	1.440	1.943	2.447

Tabla 11: t Student para método de cuantificación

2 colas	80%	90%	95%
$\alpha/2$	0.10	0.05	0.025
v			
1	3.078	6.314	12.706
2	1.886	2.920	4.303
3	1.638	2.353	3.182
4	1.533	2.132	2.776
5	1.476	2.015	2.571
6	1.440	1.943	2.447
7	1.415	1.895	2.365
8	1.397	1.860	2.306
9	1.383	1.833	2.262
10	1.372	1.812	2.228

7.3. Tablas de resultados

Tabla 10: resultados del contenido de estigmasterol y beta-sitosterol en semillas de maní tostado

Muestras / inyección	muestra (g)	Estigmasterol (mg)	Sitosterol (mg)	mg de estigmasterol en 100 g de maní	mg de sitosterol en 100 g de maní
Muestra1	0,0502	0,0017	0,0225	3,33	44,27
Muestra2	0,0504	0,0017	0,0222	3,29	44,27
Muestra3	0,0498	0,0011	0,0200	2,14	44,54
Muestra4	0,0503	0,0012	0,0199	2,32	44,10
Muestra5	0,0499	0,0017	0,0226	3,31	44,45
Muestra6	0,0498	0,0020	0,0224	3,93	44,54
Muestra7	0,0502	0,0025	0,0216	4,91	44,18
Muestra8	0,0502	0,0016	0,0203	3,13	44,18
Muestra9	0,0500	0,0012	0,0232	2,42	44,36
Muestra10	0,0502	0,0026	0,0206	5,13	44,18
Promedio	0,0501	0,0017	0,0215	3,39	44,31
D. estándar	0,000	0,0005	0,0012	1,02	0,157
CV	0,000	0,3013	0,0567	0,30	0,004

Tabla 12: resultados del contenido de estigmasterol y beta-sitosterol en aceite de maní

Muestras / inyección	muestra (g)	Estigmasterol (mg)	Sitosterol (mg)	mg de estigmasterol en 100 g de aceite	mg de sitosterol en 100 g de aceite
Muestra1	0,0236	0,0017	0,0225	7,08	95,36
Muestra2	0,0237	0,0017	0,0222	6,97	93,63
Muestra3	0,0234	0,0011	0,0200	4,57	85,23
Muestra4	0,0236	0,0012	0,0199	4,91	84,09
Muestra5	0,0235	0,0017	0,0226	7,08	96,19
Muestra6	0,0234	0,0020	0,0224	8,42	95,49
Muestra7	0,0236	0,0025	0,0216	10,43	91,34
Muestra8	0,0236	0,0016	0,0203	6,65	86,21
Muestra9	0,0235	0,0012	0,0232	5,15	98,81
Muestra10	0,0236	0,0026	0,0206	10,89	87,40
Promedio	0,0235	0,0017	0,0215	7,21	91,38
D. estándar	0,0001	0,0005	0,0012	2,17	5,267
CV	0,0042	0,3013	0,0567	0,30	0,058