

# Validación por verificación del método colorimétrico de la antrona para la cuantificación de ramnolípidos

## *Verifying Validation of the Anthrone Colorimetric Method for Rhamnolipids Quantification*

MSc. Odalys Rodríguez-Gámez, Javier E. Vilasó-Cadre, Lic. Isabel Aguilera-Rodríguez,  
Dra. Rosa M. Pérez-Silva, Dra. Arelis Ábalos-Rodríguez  
[oroga@cebi.uo.edu.cu](mailto:oroga@cebi.uo.edu.cu); [javier.vilaso@cebi.uo.edu.cu](mailto:javier.vilaso@cebi.uo.edu.cu); [isabel@cebi.uo.edu.cu](mailto:isabel@cebi.uo.edu.cu);  
[rmaria@cebi.uo.edu.cu](mailto:rmaria@cebi.uo.edu.cu); [aabalos@cebi.uo.edu.cu](mailto:aabalos@cebi.uo.edu.cu)



Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

### ● Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo realizar la validación por verificación del método colorimétrico de la antrona para cuantificar ramnolípidos en un medio de cultivo microbiano. Para ello se determinaron los parámetros: linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación y la robustez. Se demostró que el ensayo es lineal y exacto en el rango de 10-70  $\mu\text{g/mL}$  de carbohidratos; se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 3 % para la repetibilidad, y se determinó que tiene un límite de detección igual a 1,63  $\mu\text{g/mL}$  y un límite de cuantificación de 5,45  $\mu\text{g/mL}$ . Se comprobó que el método es robusto frente a variaciones en la temperatura y tiempo de calentamiento así como a la cantidad de reactivo añadido a las muestras.

Palabras clave: validación, antrona, ramnolípidos, método colorimétrico.

### ● Abstract

This paper aims to validate by checking of anthrone colorimetric method to quantify rhamnolipids in microbial culture medium. Linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantitation and robustness: This parameters were determined. It was demonstrated that the assay is linear and accurate in the range of 10-70  $\mu\text{g/mL}$  of carbohydrates, coefficients lower than 3% variation for repeatability were obtained, and were found to have a detection limit equal to 1,63  $\text{mg / mL}$  and a limit of quantification of 5,45  $\text{g / mL}$ . It was found that the method is robust against variations in temperature and heating time as well as the amount of reagent added to the samples.

Keywords: validation, anthrone, rhamnolipid, colorimetric method.

### ● Introducción

Los glicolípidos son biosurfactantes microbianos compuestos por uno o dos carbohidratos combinados con uno o varios ácidos grasos, hidroxíácidos grasos o alcoholes grasos. Debido al alto rendimiento y la posibilidad de utilizar recursos renovables para su producción, se considera que son los más prometedores para su utilización y producción comercial /1/. Los glicolípidos mejores estudiados

son los ramnolípidos, en los cuales una o dos moléculas de ramnosa están unidas a una o dos moléculas de ácido  $\alpha$ -hidroxidecanoico. La producción de estos compuestos fue descrita por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* por Jarvis y Johnson /2/.

Para la determinación del contenido de ramnolípidos en un medio de cultivo se ha reportado el empleo de diferentes métodos analíticos, como son

las técnicas colorimétricas de la antrona/3/, el orcinol /4/ y el método del fenol-sulfúrico /5/, y métodos cromatográficos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) /6/ y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) /7/, los cuales son utilizados, además, para la caracterización estructural de estos compuestos.

Entre los ensayos colorimétricos, el método de la antrona es uno de los más utilizados, el cual se ha empleado para determinar azúcares solubles en muestras diversas, como tejidos vegetales /8, 9/, productos biofarmacéuticos /10/, muestras de factor de transferencia /11/ y determinación de glicolípidos en diferentes muestras /12, 13/. Se basa sobre la reacción del derivado hidroximetilfurfural (formado por la deshidratación del azúcar en medio ácido caliente) con la antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) para formar un compuesto de color verde con una absorción máxima a 630 nm /13/.

El método de la antrona es rápido, sencillo (no requiere un instrumental muy sofisticado) y muy utilizado tanto para la detección de glicolípidos como para su cuantificación. Otra ventaja que tiene el método es que se pueden tratar grandes cantidades de muestras a escala de microplacas de titulación /10/.

La validación de un método analítico es el proceso a través del cual se obtiene evidencia documentada que dicho método conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos /14/. Esta capacidad del método de aportar resultados fiables se manifiesta mediante parámetros como la linealidad, precisión exactitud y robustez, entre otros. Por otra parte, la verificación de un método no es más que la acción que el laboratorio realiza previo a la introducción de un método en la rutina de trabajo, para comprobar y documentar su competencia /15/.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar la validación por verificación del método colorimétrico de la antrona para la cuantificación de un ramnolípido en muestras de medio de cultivo, según NC TS 368: 2010 para su posterior implementación en los análisis de rutina.

## ● Materiales y métodos

### *Materiales y equipos*

Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 Merck UV-visible a 625 nm con celda de vidrio con paso de luz de 1.0 cm. Todos los reactivos empleados fueron de calidad puro para análisis.

### *Reactivo antrona/sulfúrico*

El reactivo de antrona/sulfúrico se preparó en el momento de realizar el análisis disolviendo 0,2 g de 9,10 dihidro-9-oxoantraceno (antrona) (0,2 %) en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 %), para una concentración final de 2 gL<sup>-1</sup>. Durante su empleo se conservó en frasco ámbar y protegido de la luz /13/.

### *Procedimiento analítico*

El ensayo se realizó según procedimiento descrito por Sim *et al.* (1997) /16/. Se tomaron 1,25 mL de muestra y se mezclaron con 2,5 mL de reactivo antrona en tubos de ensayos con tapas de rosca, inmersos en agua fría (10-15 °C). Se agitaron en un vórtex, se colocaron durante 15 min en baño de agua a 100 °C y posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente por 1 h. Se determinó la absorbancia por triplicado, a 625 nm contra blanco de reactivo.

La determinación de la concentración se evaluó mediante curva de calibración. Para ello se preparó una solución patrón de ramnosa de 1 g·L<sup>-1</sup>, a partir de la cual se prepararon patrones desde 10 µg·mL<sup>-1</sup> hasta 70 µg·mL<sup>-1</sup>, los cuales recibieron el mismo tratamiento que las muestras.

### *Tratamiento previo de las muestras*

Las muestras de medio de cultivo se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min para separar las células bacterianas. El sobrenadante se acidificó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado hasta pH = 2 unidades y se dejó en reposo toda la noche a 4 °C. El glicolípido precipitado se obtuvo por centrifugación a 4 000 rpm por 10 min. Se resuspendió en cloroformo y luego de la evaporación del solvente a temperatura ambiente, se disolvió en 2 mL de agua destilada.

### Parámetros evaluados para la validación del método

Para realizar la verificación del método se evaluaron los siguientes parámetros:

**Linealidad:** De la solución patrón de ramnosa de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener concentraciones de 10, 20, 30, 50 y  $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , y realizar el procedimiento para un tamaño de muestra  $n = 10$ . Se determinó la recta de regresión lineal y se determinaron los coeficientes de determinación y correlación ( $r$  y  $r^2$ ).

**Precisión:** El criterio de precisión verificado fue la repetibilidad y se determinó mediante el cálculo de las desviaciones estándar y típica relativa (coeficiente de variación), de los resultados obtenidos de los análisis a tres niveles de concentración, para  $n = 10$ .

**Exactitud o veracidad:** Para determinar el grado de exactitud de un método analítico existen varias pruebas según la disponibilidad o no de un material de referencia o de un método de referencia. Cuando no se dispone de materiales de referencia, debe determinarse el porcentaje de recuperación /17/.

El porcentaje de recuperación del analito añadido se calcula como 100 veces la diferencia entre las medias de las series dividida entre la cantidad de analito añadida:

$$\%R = \frac{C.A - S.A}{A} \cdot 100$$

donde:

C.A = cantidad ensayada (muestra con analito añadido).

S.A = cantidad original en la muestra (sin analito añadido).

A = cantidad de analito añadido.

Para determinar el porcentaje de recuperación, se realizaron cuatro determinaciones en muestras patrón, añadiendo 30 mg de analito.

**Límite de cuantificación:** Se evaluó como diez veces la desviación típica estándar de veinte muestras blanco.

**Límite de detección:** Se evaluó como tres veces la desviación típica estándar de veinte muestras blanco.

**Robustez:** Se realizó un diseño factorial  $2^3$ , considerando las variables: cantidad de reactivo antrona/sulfúrico añadido, temperatura del baño caliente y tiempo de incubación en el baño. Se realizaron ocho determinaciones.

### ● Resultados y discusión

El método de la antrona ha sido muy utilizado para la determinación de carbohidratos totales en diferentes matrices, pero la complejidad de un medio de cultivo como matriz conlleva a esta validación por verificación del método, la cual se realizó con el objetivo de comprobar y documentar que el método en cuestión es competente para la finalidad que se quiere.

#### Linealidad

Para comprobar la linealidad del método se determinó la recta de mejor ajuste por el análisis de regresión de los mínimos cuadrados (figura 1).

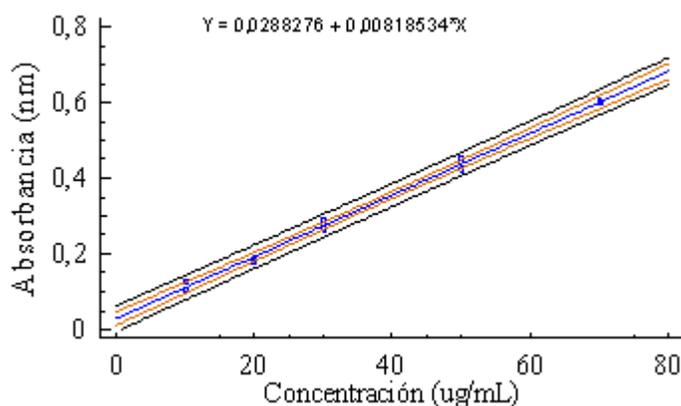


Fig. 1 Curva de calibración para la determinación de glicolípidos por el método de la Antrona.

Las características de la regresión: pendiente (b), intercepto (a), coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y error estándar se calcularon, y los resultados se resumen en la tabla 1.

**TABLA 1. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO DE LA ANTRONA**

Parámetro	Valores
Ec. de regresión y*	$y = 0,0082x + 0,0288$
Pendiente (b)	0,0082
Intercepto (a)	0,0288
Coef. de correlación (r)	0,9979
Coef. de determinación ( $r^2$ )	0,9959
Error estándar	0,0126447
* $y = ax + b$ donde x es la concentración de glicolípido en $\mu\text{g mL}^{-1}$	

El estadístico  $r^2$  (coeficiente de determinación) indica que el modelo ajustado explica el 99,59% de la variabilidad observada y el coeficiente de correlación, con un valor de 0,9979, demuestra que existe una dependencia lineal entre la concentración y la señal analítica en el intervalo evaluado.

Un hecho que corrobora la linealidad del método es el gráfico de los residuos (la diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo ajustado) en función de la concentración (figura 2). Como se observa en la figura, se obtuvo que los puntos están distribuidos al azar alrededor del eje X, indicando que la curva es realmente

lineal hasta los  $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ramnolípidos, valor que está en correspondencia con lo reportado en otros trabajos /11, 13/, en los que se describe un comportamiento de linealidad hasta los  $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

En la tabla 2 se muestra el análisis de varianza (Anova) del modelo de regresión, se observa que el  $F_{\text{calculado}} = 1944,36$  y el  $F_{\text{tabulado}} (P=0,05) = 7,7E-11$ , por lo que  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ , lo cual demuestra que existe una buena correlación entre la absorbancia y la concentración, lo que permite evaluar la concentración de ramnolípidos por los valores de absorbancia obtenidos.

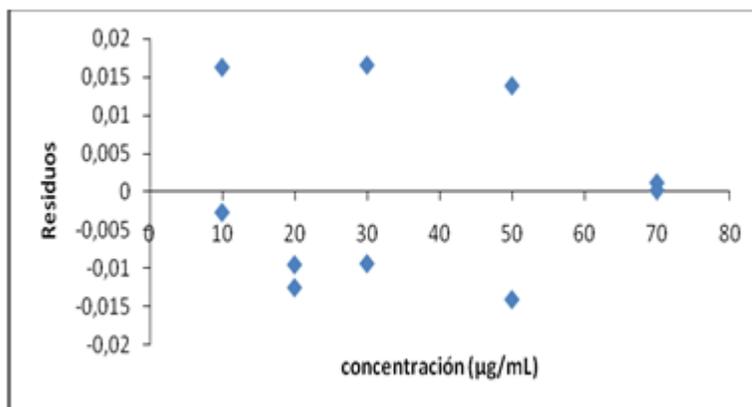


Fig. 2 Gráfico de residuos  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

TABLA 2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO DE REGRESIÓN OBTENIDO

	GL	SC	CM	F	Significación de F
Regresión	1	0,310 879 4	0,310 879 4	1 944,358 12	7,721 3E-11
Residuos	8	0,001 279 1	0,000 159 89		
Total	9	0,312 158 5			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95 %	Superior 95 %
Intercepto	0,028 827 6	0,007 787 6	3,701 716 0	0,006 027 7	0,010 869 3	0,046 785 9
$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,008 185 34	0,000 185 63	44,094 876 3	7,721 3E-11	0,007 757 28	0,008 613 41

### Precisión y exactitud

La precisión de un método depende solamente de la distribución de los errores aleatorios, que no está asociada con el valor verdadero y se expresa generalmente como la desviación típica del resultado analítico.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad y los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental reactivos tiempo, etcétera) /14/.

Para evaluar la precisión se hizo un estudio de la repetibilidad, donde se evaluó la variabilidad del método efectuando los análisis sobre una muestra en condiciones operativas idénticas (analista, equipo y reactivos) en un laboratorio. Para ello se realizaron cinco determinaciones a muestras de tres soluciones patrones a concentraciones de 10, 40 y 70  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  correspondientes a los niveles bajo, medio y alto de la curva patrón, respectivamente, y se calculó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración. La tabla 3 muestra los resultados de la prueba de repetibilidad.

TABLA 3. DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE LA ANTRONA

Nº de análisis	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $C_{\text{cal}}$	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $C_{\text{cal}}$	70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $C_{\text{cal}}$
1	9,63	40,24	70,12
2	9,39	41,71	71,22
3	10,12	41,46	69,27
4	9,76	40,73	70,00
5	10,02	41,39	69,98
Media	9,78	41,11	70,12
S	0,29	0,60	0,70
CV (%)	3,01	1,47	0,99

En los tres niveles de concentración evaluados el coeficiente de variación fue inferior al 3 %, lo que equivale a una buena precisión del método. Como se observa (tabla 3), a medida que aumenta la concentración del analito, disminuye el coeficiente de variación. Se plantea que uno de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis

es la concentración del analito. Cuando se trabaja a concentraciones altas del analito se aceptan valores de coeficientes de variación más bajos que cuando se trabaja a bajas concentraciones. Esto se debe a que los errores aleatorios medidos como desviaciones típicas relativas aumentan al disminuir la concentración del analito /14/.

La exactitud indica que los resultados que se obtienen con un método analítico están próximos al valor verdadero o al que se acepta convencionalmente como valor verdadero. Para determinar si el método de la antrona es exacto se realizó la prueba de recuperación a cuatro muestras de una solución patrón de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a las cuales se les añadió una cantidad conocida del analito.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos, los cuales se encuentran

entre el 80 % y el 110 %, sugiriendo que el método tiene una exactitud aceptable. Para comprobar que la recuperación es satisfactoria se realizó una prueba-t donde se comparó la media de recobrado obtenida con respecto al 100 % (recobrado teórico). Debido a que el p-valor para esta prueba es mayor o igual a 0,05 ( $p = 0,064$ ), no se rechaza la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95,0 % y, por tanto se concluye que el 89,73 % de recuperación obtenido representa el 100 % de recuperación.

**TABLA 4. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE EXACTITUD DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE LA ANTRONA**

Concentración patrón ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Cantidad añadida de analito ( $\mu\text{g}$ )	Conc. calculada ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	% Recuperación
20	30	49,88	88,62
20	30	51,10	94,31
20	30	50,37	95,93
20	30	48,66	80,08
<b>Media</b>			<b>89,73</b>
<b>CV %</b>			<b>7,98</b>

#### *Límites de detección y cuantificación*

El límite de detección (LD) ha sido definido como la menor cantidad de analito detectable pero no cuantificable por el método de análisis en una muestra, mientras que el límite de cuantificación o de determinación (LC) es el valor mínimo de analito cuantificable por el método en una muestra /14/. Para determinar los límites de cuantificación y de detección

del método de la antrona se realizó la determinación de veinte muestras blanco de agua destilada. Los resultados se muestran en la tabla 5.

El límite de detección calculado fue de  $1,63 \mu\text{g}/\text{mL}$  y el límite de cuantificación fue  $5,45 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Ambos resultados confirman la utilidad del método para cuantificar pequeñas cantidades de ramnolípido en el medio de cultivo.

**TABLA 5. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO DE LA ANTRONA**

Parámetro	Valores
Nº de muestras	20
Media	$1,36 \mu\text{g mL}^{-1}$
Desviación estándar	$0,545 \mu\text{g mL}^{-1}$
Valor mínimo	$0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$
Valor máximo	$2,32 \mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de detección	$1,63 \mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de cuantificación	$5,45 \mu\text{g mL}^{-1}$

### Robustez

La robustez de un método analítico se define como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en análisis de rutina. Es, por tanto, la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización /14/.

Dado que el método de la antrona se fundamenta en una reacción de condensación, las condiciones de temperatura son significativas para la obtención de un buen resultado analítico. También, el método se ha

empleado con varias modificaciones en cuanto a concentración de antrona, ácido y tiempo de calentamiento en baño de agua /18/.

Por ello, para comprobar la robustez del método se realizó un diseño factorial 2<sup>3</sup>, donde se evaluaron los factores: temperatura, tiempo de calentamiento y proporción de reactivo añadido con respecto a la muestra. Se trabajó a dos niveles para cada factor y se realizaron un total de 8 determinaciones.

En los resultados del análisis ANOVA (tabla 6), se pudo comprobar que ninguno de los factores estudiados, ni la combinación de estos, influye significativamente en los resultados analíticos del método ( $p$ -valor > 0,05) con un nivel de confianza del 95 %, lo que demuestra que el método de la antrona es robusto frente a los factores estudiados.

TABLA 6. RESULTADOS DEL ANOVA PARA EL ENSAYO DE ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE ANTRONA

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Cantidad de Antrona	0,000 021 125	1	0,000 021 125	0,01	0,923 0
B: Temperatura	0,001 770 13	1	0,001 770 13	1,24	0,466 2
C: Tiempo	0,005 253 12	1	0,005 253 12	3,67	0,306 2
AB	0,001 770 13	1	0,001 770 13	1,24	0,466 2
AC	0,002 926 12	1	0,002 926 12	2,04	0,388 5
BC	0,002 850 12	1	0,002 850 12	1,99	0,392 5
Error total	0,001 431 13	1	0,001 431 13		
Total (corr.)	0,016 021 9	7			

### Determinación de ramnolípidos en muestras de medio de cultivo

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación del método, se procedió a la cuantificación del glicolípido en el medio de cultivo (tabla 7).

La concentración media obtenida fue de  $483 \pm 0,026 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  con un coeficiente de variación de 5,08 %, lo que demuestra que el método es efectivo en la cuantificación de ramnolípidos en el medio de cultivo.

TABLA 7. DETERMINACIÓN DEL GLICOLÍPIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE LA ANTRONA

Nº de muestras	Nº de determinaciones	Concentración de glicolípido (media) ( $\text{g L}^{-1}$ )	DS	CV (%)
1	5	0,49	0,026	5,08



## Conclusiones

**Los resultados del estudio de la validación por verificación del método de la antrona para la determinación de ramnolípidos en muestras de cultivo, indican que el método es adecuado y proporciona datos confiables para ser utilizado como análisis de rutina en la cuantificación de moléculas biosurfactantes.**



## Bibliografía

1. KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. "Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants - from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers". *J. Biosci. Bioeng.* 2002, 94, p. 187-201.
2. JARVIS, F.; JOHNSON, M. "A Glycolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa*". *Am. Chem. Soc.* 1949. 71, p. 4124-4126.
3. OCORO, C. "Influence of Growth Media Composition on the Emulsifying Activity of Bioemulsifiers Produced by four Bacterial Isolates with Wide Substrate Specificity". *Am. J. Biotechnol. Mol. Sci.* 2011, 1, 1, p. 1-7.
4. SARAVANAN, V.; VIJAYAKUMAR, S. "Isolation and Screening of Biosurfactant Producing Microorganisms from Oil Contaminated Soil". *J. Acad. Indus. Res.* 2012, 1, 5, p. 264-268.
5. ABOUSEOUD, M., *et al.* "Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*". *Desalination.* 2008, 223, p. 143-151.
6. DAS, P., *et al.* "Substrate Dependent Production of Extracellular Biosurfactante by a Marine Bacterium". *Bioresource Technology.* 2009, 100, p. 1015-1019.
7. FERHAT, S., *et al.* "Screening and Preliminary Characterization of Biosurfactants Produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soils". *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2011. 65, 8, p. 1182-1188.
8. DEVOR, A.; BAKER, W.; DEVOR, K. "Effect of Toluene and Similar Compounds on the Carbohydrate Anthrone Reaction". *Clin. Chem.* 1964, 10, p. 597-599.
9. YASAR, S. "Spectrophotometric Determination of Hexose and Pentose Amounts by Artificial Neural Network Calibration and its Using in Wood Analysis". *Acta Chim. Slov.* 2005, 52, p. 435-439.
10. LEYVA, A., *et al.* "Rapid and Sensitive Anthrone-Sulfuric Acid Assay in Microplate Format to Quantify Carbohydrate in Biopharmaceutical Products: Method development and validation". *Biologicals.* 2008, 36, p. 136-141.
11. SÁNCHEZ, K., *et al.* "Validación del ensayo para determinar la concentración de carbohidratos en muestras de factor de transferencia". *Revista Cubana de Química.* 2009, XXI, 1, p. 68-73.
12. MAHESH, N.; MURUGESH, S.; SRINIVASAN, V. "Determination of the Presence of Biosurfactante Produced by the Bacteria Present in the Soil Samples". *Research Journal of Microbiology.* 2010, 5, 10, p. 1031-1037.
13. HODGE, J.; HOFREITER, B. "Determination of reducing sugars and carbohydrates. I. Analysis and preparation of sugars". In: WHISTLER, R. and WOLFROM, M. (eds) *Methods in Carbohydrate Chemistry.* Vol. I, Academic., New York, 380, 1962.
14. AGUIRRE, L., *et al.* "Generalidades, materias primas y especialidades farmacéuticas". En: *Validación de métodos analíticos.* AEFI, 2001. P. 45-130.
15. NC-TS 368. *Guía para la validación de métodos químicos de ensayo en alimentos.* 2010.
16. SIM, L.; WARD, O.; LI, Z-Y. "Production and Characterisation of a Biosurfactant Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 1997, 19, p. 232-238.
17. BANDEIRA, R., *et al.* "Development and Validation of a Method for the Analysis of Ochratoxin a in Roasted Coffee by Liquid Chromatography/Electrospray-Mass Spectrometry in Tandem (lc/esi-ms/ms)". *Quim. Nova.* 2012, 35, 1, p. 66-71.
18. CERNING-BEROARD, J. "A Note on Sugar Determination by the Anthrone Method". *Ana. Chem.* 1975, 52, p. 857-860.