

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES**

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CANNABIDIOL (CBD) EN INFLORESCENCIAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (HPLC/DAD).

AUTOR:

LAURA GABRIELA ENRÍQUEZ NARANJO

Guayaquil - Ecuador

2025

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

RESUMEN

El interés científico en la planta de *Cannabis sativa*, sus metabolitos y sus potenciales aplicaciones terapéuticas ha experimentado un auge sin precedentes en la última década. Debido a sus propiedades medicinales, el cannabidiol (CBD), se ha convertido en el cannabinoide principal de numerosos estudios, impulsando así la investigación tanto en el ámbito clínico como en el analítico. Las inflorescencias, al contener la carga metabólica más alta, son la matriz de principal utilidad para la posterior extracción del analito, generación extractos, productos derivados y para el enriquecimiento investigativo que surja en torno al CBD en el laboratorio. El enfoque de esta investigación radicó en el desarrollo y validación de un método analítico para determinar el contenido de CBD en inflorescencias por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), se evaluó los distintos parámetros de validación según lo que establece la norma AOAC 2018.10, permitiendo obtener resultados que garantizan la competencia analítica en cada ensayo con la confianza y la veracidad, que respaldan la calidad del laboratorio. Los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros de calidad han permitido satisfacer cada objetivo de validación llegando a obtener un método selectivo con una resolución mayor a 1,5; en cuanto a LOD: 0,29 mg/g, LOQ: 0,87 mg/g; la linealidad evaluada por día superó un r^2 de 0,995; el %RSDr tanto para nivel alto como para el nivel bajo reportó 1,45% y 4,76% respectivamente; para %RSDi a nivel alto se obtuvo 3,43% y a nivel bajo 3,67%; la recuperación para nivel bajo fue 93,56% y para el nivel alto 99,14%; finalmente en robustez el método resultó sensible a variaciones. Según resultados reportados por cada parámetro, queda validado el método desarrollado para el laboratorio de Química médica de la universidad del Azuay con sus respectivas recomendaciones.

Palabras clave: CBD, HPLC-DAD, cannabinoides, validación, calidad.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

ABSTRACT

Scientific interest in the *Cannabis sativa* plant, its metabolites and potential therapeutic applications has experienced an unprecedented boom in the last decade. Due to its medicinal properties, cannabidiol (CBD), has become the main cannabinoid of numerous studies, thus boosting research in both clinical and analytical fields; inflorescences, containing the highest metabolic load, are the main useful matrix for the subsequent extraction of the analyte, generation of extracts, derivative products and for the research enrichment that arises around CBD in the laboratory. The focus of this research was the development and validation of an analytical method to determine the CBD content in inflorescences by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), the different validation parameters were evaluated according to the AOAC 2018.10 standard, allowing to obtain results that guarantee the analytical competence in each test with confidence and veracity, which support the quality of the laboratory. The results obtained for each of the quality parameters allowed satisfying each validation objective, obtaining a selective method with a resolution greater than 1.5; for LOD: 0.29 mg/g, LOQ: 0.87 mg/g; the linearity evaluated per day exceeded an r^2 of 0.995; the %RSDr for both high level and low level was 1.45% and 4.76% respectively; for %RSDi at high level 3.43% was obtained and low level 3.67%; the recovery for low level was 93.56% and high level 99.14%; finally in robustness the method resulted sensitive to variations. According to the results reported for each parameter, the method developed for the laboratory of Medicinal Chemistry of the University of Azuay is validated with its respective recommendations.

Keywords: CBD, HPLC-DAD, cannabinoids, validation, quality.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

DEDICATORIA

Para mis seres especiales que en cuerpo y espíritu me han acompañado a lo largo de esta investigación destacando:

A mi compañera de vida y pareja Mel, por su apoyo incondicional, paciencia, compañía y amor a lo largo de este camino.

A mis papis, por darme la vida, la fuerza y la motivación para continuar creciendo como persona y profesional día a día.

A mis dos abuelitas, que desde la eternidad y en mi corazón representan una luz en mis pasos.

A todos mis animalitos, que sin hablar expresan su fidelidad y apoyo en cada mirada.

Gracias a todos por ser esa parte especial e importante en mi vida.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

AGRADECIMIENTO

Para todos quienes han hecho posible el desarrollo de este trabajo, inmensa gratitud a mi gran ser espiritual que me da la energía y fuerza para salir triunfante en cada paso; agradecimiento total a mi lugar de trabajo, la Universidad del Azuay, y compañeros por brindarme los recursos necesarios y apoyo para culminar con éxito esta investigación, agradezco a mi tutor y profesores de la Escuela Superior Politécnica de Litoral que han sabido compartir su conocimiento y servir de gran referencia y guía a lo largo de la maestría; finalmente deseo expresar gratitud a mis compañeros de maestría, quienes, como equipo, han demostrado que, con planificación, creatividad y compromiso, cualquier meta es alcanzable.

“Que la fuerza nos acompañe”

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

Laura Gabriela Enríquez Naranjo.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Joel Vielma Puente, PhD.
PRESIDENTE

Michael Rendón Morán, Mgtr
TUTOR

César Araque Molina, PhD.
DOCENTE EVALUADOR

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

ABREVIATURAS O SIGLAS

AOAC: Association of Analytical Communities

CBD: Cannabidiol

THC: Tetrahidrocannabinol

CBN: Cannabinol

CBG: Cannabigerol

THCA: Ácido Tetrahidrocannabinólico

CBDA: Ácido Cannabidiólico

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

DAD: Diode array detector

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

SMPR: Standard Method Performance Requirements

Si: desviación estándar precisión intermedia

Vi: Varianza intermedia

VL: Varianza intralaboratorio

DCMW: Diferencia promedia de cuadrados dentro de grupos (Varianza de repetibilidad)

DCMB: Diferencia promedia de cuadrados entre grupos (Varianza de reproducibilidad)

RSDr: coeficiente de variación de repetibilidad

RSDi: coeficiente de variación de repetibilidad intermedia

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
DECLARACIÓN EXPRESA	VI
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	VII
ABREVIATURAS O SIGLAS.....	VIII
AOAC: Association of Analytical Communities.....	VIII
TABLA DE CONTENIDO	IX
LISTADO DE FIGURAS.....	XIII
LISTADO DE TABLAS	XV
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes	2
1.2. Descripción del Problema	5
1.3. Objetivos	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos	7
1.4. Hipótesis	7
1.5. Alcance	8
CAPÍTULO 2.....	9
2. MARCO TEÓRICO	9

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

2.1. Introducción al Cannabidiol (CBD) y los Cannabinoides de la <i>Cannabis sativa</i>	9
2.1.1 Caracterización general de la planta <i>Cannabis sativa</i> y sus metabolitos principales.	10
2.1.2 Propiedades, importancia y aplicaciones terapéuticas del CBD .	13
2.2. Importancia del Análisis de Cannabinoides en Inflorescencias.....	15
2.2.1 Relevancia de las inflorescencias como fuente de extracción de cannabinoides.....	15
2.2.2 Importancia del control de calidad en productos derivados del CBD y su impacto en la industria de la salud y farmacéutica.	16
2.3. Métodos de Análisis para la Cuantificación de CBD	17
2.3.1 Métodos tradicionales de análisis de cannabinoides y sus limitaciones.	18
2.3.2 Ventajas de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) frente a otras técnicas analíticas.	19
2.4. Fundamentos de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC/DAD).....	20
2.4.1 Principios y funcionamiento de HPLC y DAD.....	20
2.4.2 Aplicación del método HPLC/DAD para la identificación y cuantificación de cannabinoides.	22
2.5. Conceptos y Criterios de Validación de Métodos Analítico.	22
2.5.1 Definición y propósito de la validación de métodos analíticos en el contexto de control de calidad.	22
2.5.2 Parámetros de validación según la norma AOAC 2018.10.	23
2.6. Normativas y Guías para la Validación de Métodos Analíticos en Laboratorios de Química	25

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT- 21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

2.6.1	Revisión de la normativa AOAC 2018.10 y su aplicación en la validación de métodos para análisis de cannabinoides.	25
2.6.2	Importancia del cumplimiento normativo para la acreditación y competitividad analítica en laboratorios.	26
2.7.	Implicaciones de la Validación de Métodos para la Cuantificación de CBD en la Investigación, la Industria y rol de la validación en el fortalecimiento de la competencia analítica de los laboratorios de investigación.....	26
CAPÍTULO 3.....		28
3.	METODOLOGÍA	28
3.1.	Enfoque de la investigación	28
3.1.1	Tipo de investigación	28
3.1.2	Diseño de investigación	28
3.2.	Metodología	29
3.2.1	Variables.....	29
3.2.2	Diseño experimental	29
3.3.	Recolección de datos.....	30
3.3.1	Métodos y técnicas	30
3.3.1.1	Procedimiento para la cuantificación de CBD en inflorescencias.	30
3.4.	Recursos	40
3.4.1	Equipamiento	40
3.5.	Análisis Estadístico	41
CAPÍTULO 4.....		44
4.	RESULTADOS	44

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT- 21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

4.1. Desarrollo de la metodología para la validación CBD en inflorescencias de la <i>Cannabis sativa</i>	44
4.2. Resultados de la validación.....	48
4.2.1 Selectividad.....	48
4.2.2 Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	49
4.2.3 Linealidad.....	50
4.2.4 Precisión	51
4.2.5 Exactitud	54
4.2.6 Robustez.....	56
4.3. Evaluación de resultados.	57
Nota: La tabla está en función del cumplimiento de los objetivos	58
CAPÍTULO 5.....	61
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
Referencias	63
Apéndices y anexos	67

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Anatomía de la planta	11
Figura 2.2 Estructura de los principales cannabinoides	12
Figura 2.3 Mecanismo de descarboxilación CBDA a CBD.....	13
Figura 2.4 Estructura de los tricomas.....	16
Figura 2.5 Mecanismo de funcionamiento del HPLC-DAD	21
Figura 3.1 Diagrama de flujo de la preparación de muestra	31
Figura 4.1 Prueba 1 patrón 5 ppm de CBD	45
Figura 4.2 Prueba 2 patrón 10 ppm de CBD	46
Figura 4.3 Prueba 3 muestra fortificada de CBD.....	46
Figura 4.4 Prueba 4 patrón 5 ppm de CBD	47
Figura 4.5 Prueba 5 muestra aleatoria.....	47
Figura 4.6 Metodología para la validación de CBD	48
Figura A1 Espectro de Absorción molecular UV de muestra no fortificada.....	67
Figura A2 Espectro de Absorción molecular UV de muestra fortificada.....	67
Figura A3 Espectro de Absorción molecular UV del estándar de 1ppm.....	68
Figura A4 Cromatograma del patrón de 1ppm réplica 1.....	68
Figura A5 Cromatograma de la muestra sin fortificar réplica 1.....	68
Figura A6 Cromatograma de la muestra fortificada réplica 1.....	68
Figura B1 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 1.....	69
Figura B2 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 2.....	69
Figura B3 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 3.....	70
Figura B4 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 4.....	70
Figura B5 Datos levantados LOD Y LOQ.....	71
Figura C1 Resumen estadística de regresión día 1.....	72
Figura C2 Gráfico de residuales día 1.....	73
Figura C3 Gráfico de regresión lineal día 1.....	73

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT- 21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Figura C4 Resumen estadística de regresión día 2	74
Figura C5 Gráfico de residuales día 2.....	75
Figura C6 Gráfico de regresión lineal día 2	75
Figura C7 Resumen estadística de regresión día 3.....	76
Figura C8 Gráfico de residuales día 3.....	77
Figura C9 Gráfico de regresión lineal día 3.....	77
Figura D1 Determinación de repetibilidad intermedia nivel bajo.....	78
Figura D2 Análisis de la varianza nivel bajo.....	78
Figura D3 Determinación de repetibilidad intermedia nivel alto.....	79
Figura D4 Análisis de la varianza nivel alto.....	79
Figura E1 Datos evaluación robustez.....	80

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	21-V01	
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Taxonomía de la Planta	10
Tabla 2.2 Propiedades Terapéuticas del CBD	14
Tabla 3.1 Preparación de soluciones estándar	32
Tabla 3.2 Condiciones cromatográficas para determinación de CBD	33
Tabla 3.3 Diseño experimental de validación.....	34
Tabla 3.4 Matriz Youden Steiner.....	37
Tabla 3.5 Parámetros de variación para evaluar robustez	38
Tabla 3.6 Objetivos de Validación.....	39
Tabla 3.7 Materiales.....	40
Tabla 3.8 Reactivos	40
Tabla 3.9 Estándar.....	40
Tabla 3.10 Equipos	41
Tabla 4.1 Resultados de resolución en evaluación de selectividad	49
Tabla 4.2 Error típico y pendiente	50
Tabla 4.3 Valores de LOD y LOQ del método.....	50
Tabla 4.4 Estadística para las curvas de calibración por día	51
Tabla 4.5 Resultados de precisión evaluado como repetibilidad a nivel bajo	51
Tabla 4.6 Resultados de precisión evaluado como repetibilidad a nivel alto	52
Tabla 4.7 Datos levantados para evaluación de precisión intermedia a nivel bajo	52
Tabla 4.8 Datos de los grupos	53
Tabla 4.9 Resultados de precisión evaluado como precisión intermedia a nivel bajo	53
Tabla 4.10 Datos levantados para evaluación de precisión intermedia a nivel alto	53

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.11 Resultados de precisión evaluado como precisión intermedia a nivel alto	54
Tabla 4.12 Datos para evaluación de exactitud como recuperación a nivel bajo ..	54
Tabla 4.13 Resultados de recuperación a nivel bajo.....	55
Tabla 4.14 Datos para evaluación de exactitud como recuperación a nivel alto ...	55
Tabla 4.15 Resultados de recuperación a nivel alto.....	55
Tabla 4.16 Datos levantados para evaluación de robustez.....	56
Tabla 4.17 Datos de desviación estándar a nivel alto para evaluación de robustez	56
Tabla 4.18 Resultados de la evaluación de robustez	57
Tabla 4.19 Resultados de los parámetros de validación	58

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Las inflorescencias de la planta de *Cannabis sativa* contienen la carga metabólica más abundante de toda la planta; entre estos componentes activos se destacan principalmente los cannabinoides que han sido sujeto de varios estudios en el área de medicina por sus propiedades terapéuticas y psicoactivas en sinergia de ambas funciones en una sola especie. Los fitocannabinoides más importantes de la planta de *Cannabis sativa* y sobre los cuales se han focalizado avances investigativos han sido el tetrahidrocannabinol (THC), cannabinoide psicoactivo, y el Cannabidiol (CBD), cannabinoide con propiedades farmacológicas y no psicoactivas [1].

En diciembre de 2017 la Organización mundial de la salud (OMS), luego de meses de estudio y deliberaciones, concluyó que el CBD sirve como paliativo para enfermedades crónicas y afecciones al sistema nervioso central; además, no genera adicciones; su aprobación por parte de la OMS abrió nuevas oportunidades para la continuación de la investigación sobre los fitocannabinoides presentes en la planta.

La despenalización de la siembra, la cosecha, la producción y el consumo de la *Cannabis sativa* con fines medicinales a nivel mundial ha tomado gran auge y se ha visto el incremento de manera significativa en el interés por las plantas de cannabis y sus derivados, ya que varios países han flexibilizado las regulaciones para permitir su uso medicinal. En los últimos años se ha elevado el número de países latinoamericanos que han debatido y resuelto despenalizar su consumo. Desde el año 2019, con la despenalización del uso y producción de cannabis con fines medicinales o terapéuticos en Ecuador y, a través de la expedición de

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

licencias para su regulación; muchos han sido los interesados que han optado por emprender en este negocio y avanzar en su investigación.

Dado el impacto que ha tenido el CBD, son diversos los estudios que se han realizado con el fin de cuantificar cannabinoides principalmente rigiéndose a lo que estipula la legislación del país y el órgano regulatorio, así como también para garantizar la calidad y el contenido en productos derivados. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de métodos analíticos sencillos y accesibles que permitan cuantificar con precisión e identificar de manera confiable tanto los cannabinoides principales como los menores en la inflorescencia de la *Cannabis sativa* y sus productos derivados. El laboratorio de Química Médica, al contar con los recursos y equipamiento necesario, ha visto la oportunidad de diseñar un método analítico para cuantificar CBD con la adaptación de las condiciones idóneas para su estudio y que a posterior favorezcan controles de calidad e investigaciones derivadas sobre este analito, a continuación, se presentará los métodos y el desarrollo de la investigación.

1.1. Antecedentes

Debido al incremento industrial que ha tenido la *Cannabis sativa*, la Association of Analytical Communities (AOAC) International, en el año 2016 anunció una alianza con la industria para definir estándares voluntarios por consenso en el ámbito del cannabis. Más adelante, en el otoño de ese mismo año, un grupo de trabajo del Panel de Interesados en Métodos Analíticos estratégicos convocó al desarrollo de métodos para la medición de cannabinoides en concentrados y en materiales secos de cannabis. Como resultado de este proceso, se identificó varios cannabinoides que necesitaban un método analítico cuantitativo válido para establecer un estándar de referencia basado en consenso; esta propuesta se sustenta en los Standard Method Performance Requirements (SMPR) estándares específicos como el SMPR 2017.001 para concentrados y en el SMPR 2017.002 para materiales vegetales

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

secos. En 2017, se abrió una convocatoria para presentar métodos, y AOAC conformó un Panel de Revisión de Expertos (ERP) con el objetivo de evaluar los métodos cuantitativos desarrollados para cannabis en función de los SMPRs. Los detalles sobre la optimización y validación adicionales del método se encuentran en la publicación original. Finalmente, el método fue adoptado con el estatus de First Action Official Methods durante una segunda reunión del ERP celebrada en octubre de 2018. Luego de presentar datos adicionales de validación, se reconoció un método HPLC-DAD para la cuantificación de cannabinoides en flores secas y aceites con el estatus de First Action Official Method (OMA 2018.10) [2].

Según el Manual de Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el delito (UNODC); las matrices sobre las cuales se ha forjado un interés común para la determinación de cannabinoides son: extractos, inflorescencias, aceites, resinas y matrices biológicas bajo metodologías como: ensayos del color, inmunoensayos, Espectrometría de movilidad iónica (EMI), Cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía de gases - detector de ionización de llama (GC-FID), sin y con derivación, Cromatografía de gases Espectrometría de masa (GC-EM) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV) [3].

Otros autores detallan métodos cromatográficos para analizar cannabinoides y terpenos; para este último, la cromatografía de gases combinada con un detector de ionización de llama o espectrometría de masas se considera la técnica estándar. La cromatografía líquida con detección UV O MS es principalmente usada para determinación de cannabinoides puesto que la descarboxilación de sus formas ácidas no ocurre a temperatura ambiente. Es muy común y extendido el uso de la detección UV gracias a que todos los cannabinoides poseen cromóforos en sus estructuras, y la sensibilidad requerida va acorde con este modo de detección. Además, el uso de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) con

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

partículas de menos de 2 μm o partículas superficialmente porosas ha aumentado drásticamente el rendimiento cromatográfico en términos de tiempo de análisis, capacidad máxima y sensibilidad [4].

En un estudio llevado a cabo por un equipo de investigación para la editorial académica Springer Nature, se realizó la caracterización y cuantificación química del Cannabis mediante cromatografía de gases (CG) acoplada con espectrometría de masas (EM); este método permitió la cuantificación simultánea de los principales cannabinoides, incluyendo cannabidiol (CBD), cannabicromeno (CBC), delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), cannabigerol (CBG) y cannabinol (CBN). Se utilizó un método modificado de CG–EM para el perfil químico de cannabinoides extraídos de diversas muestras de Cannabis, especialmente de aquellas que presentan altos niveles de CBD, CBC, THC, CBG y CBN. Las recuperaciones de cannabinoides se encontraron en un rango de 80 a 100%. Además, se señaló que el metanol es un solvente excelente para la extracción de cannabinoides y flavonoides, siendo también recomendado por la monografía sobre Cannabis de la Farmacopea Herbal Americana para la preparación de soluciones estándar de cannabinoides. Los rangos lineales de los cannabinoides se establecieron en concentraciones de 0.0125 a 0.1 mg/ml, mostrando una linealidad adecuada con coeficientes de regresión superiores a 0.98. En la validación del método de GC, se evaluó la precisión, obteniendo porcentajes de desviación estándar relativa (RSD) de los cannabinoides que variaron entre 1.49% y 8.35%. Las precisiones intermedias se determinaron mediante análisis intradía e interdía, con todos los compuestos presentando rangos de RSD de 1.32% a 5.14%. Estos valores bajos de RSD indican que el método es reproducible para el análisis de cannabinoides extraídos del Cannabis [5].

En Brasil, ante la creciente demanda de productos medicinales a base de *Cannabis sativa* y la ausencia de protocolos específicos en la Farmacopea Brasileña para la

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

evaluación de cannabinoides, se desarrolló un método ágil y efectivo para la cuantificación de estos compuestos en productos terapéuticos autorizados. El procedimiento se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV), utilizando un gradiente de elución que consistió en ácido fórmico, acetonitrilo y agua, con un flujo de 0,6 mL/min y detección a 220 nm. Este método logró cuantificar el CBD con tasas de recuperación entre 104,07% y 105,35%, y el THC con una recuperación de 106,62%. Dada la importancia de establecer estándares mínimos de calidad para los productos medicinales en Brasil, se identificó la necesidad de aplicar este método a otros productos para su validación y posible inclusión en la Farmacopea Brasileña [6].

En todos los casos evaluados, el tratamiento de las muestras se centra en la extracción de cannabinoides utilizando un solvente orgánico. La variación se presenta en el método analítico; al comparar las condiciones analíticas por HPLC/DAD, que es la técnica utilizada para el análisis de CBD en este estudio, las diferencias principales radican en el tipo de columna (C18), el modo de elución (isocrática), la mezcla de solventes (metanol:acetonitrilo), el volumen de inyección (que varía entre 5 µL y 20 µL) y el flujo.

1.2. Descripción del Problema

La planta de *Cannabis sativa* genera por biosíntesis metabolitos importantes durante su maduración, entre los cuales destacan los cannabinoides Tetrahidrocannabinol (THC) y el Cannabidiol (CBD). Este último es el más estudiado e importante por ser un principio activo con características analgésicas, antiinflamatorias, anti convulsionante, neuro protectoras, no psicoactivo, entre otras [4]. El Cannabidiol (CBD) ha captado la atención predominante debido a sus propiedades, convirtiéndose en el cannabinoide más destacado en las cepas de plantas (inflorescencias). La utilización de estas inflorescencias como materia prima

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

para extraer metabolitos activos ha posibilitado la producción de derivados para su posterior distribución y consumo. La investigación de cannabinoides en inflorescencias ha sido altamente relevante desde el punto de vista analítico, dado que representan la base desde la cual se originan los productos finales, subrayando así la necesidad de un control analítico riguroso. En determinados laboratorios de Química, el CBD es un analito nuevo de interés investigativo y estudio analítico, desafortunadamente al no contar con un método validado para su cuantificación, no están en la capacidad de emitir resultados confiables que permitan asegurar la fiabilidad de estos. El laboratorio, al carecer de un procedimiento oficialmente reconocido, se encuentra en una posición limitada de competencia analítica con otros; esta situación representa una desventaja significativa para futuras investigaciones, ya que carece de la capacidad técnica y competente necesaria para cumplir con los requisitos establecidos por las normativas, así como para garantizar la solidez en los servicios de análisis relacionados con el CBD y el control de calidad. La confianza y veracidad en el reporte de resultados analíticos es el reflejo directo de que un laboratorio garantiza la calidad en sus procesos desde la toma de muestra hasta el reporte final.

Una adecuada validación analítica permitiría al laboratorio asegurarse de que el método pueda producir resultados consistentes y precisos dentro de un rango aceptable, además de confirmar la idoneidad para su uso en aplicaciones específicas. La necesidad de garantizar el contenido de CBD en flores y aceites derivados, así como la incursión investigativa en este nuevo analito, ha forjado el interés de laboratorios de química instrumental en iniciar investigaciones analíticas, no realizadas anteriormente, sobre este cannabinoide a través de la validación de un método de cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución.

La garantía en el reporte de resultados permitirá satisfacer próximas investigaciones que surjan en torno a este metabolito; el laboratorio podrá brindar servicios de análisis tanto internos como externos con el resguardo de una óptima calidad además de proporcionar información veraz y precisa que satisfaga la

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

necesidad de su usuario. Para dar solución a la problemática detallada se plantea la siguiente pregunta:

¿El método de ensayo por HPLC/DAD para la determinación de CBD, implementado en el laboratorio de Química médica cumple con los requisitos de validación establecidos en la norma AOAC 2018.10?

1.3. Objetivos

Objetivo General

Validar un método de ensayo para la cuantificación de Cannabidiol (CBD) en matrices de inflorescencias mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD).

Objetivos Específicos

- Desarrollar la metodología para la validación de CBD en el laboratorio de Química Médica de la Universidad del Azuay.
- Diseñar el plan de validación para la determinación de CBD en inflorescencias de acuerdo a los criterios y parámetros establecidos por la norma AOAC 2018.10.
- Evaluar los resultados obtenidos durante el proceso de validación para la verificación del cumplimiento de los objetivos de validación establecidos.

1.4. Hipótesis

El método desarrollado para la cuantificación del cannabinoide CBD satisface los criterios establecidos por la validación de acuerdo a la norma AOAC 2018.10.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT- 21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

1.5. Alcance

Esta investigación se desarrolló para la cuantificación del CBD en inflorescencias de la *Cannabis sativa* para el laboratorio de Química Médica de la Universidad del Azuay. Se efectuó el cumplimiento de los objetivos en cada uno de los criterios que establece y documenta el proceso de validación con miras hacia nuevas investigaciones con garantía, calidad y fiabilidad en los resultados. La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC DAD), cumpliendo con los parámetros de calidad que establece la validación del ensayo. Los criterios que se cumplieron según lo que estipulado por la norma son: Selectividad; Límite de detección (LOD); Límite de cuantificación (LOQ); linealidad en el rango de trabajo y para inflorescencias; Veracidad; precisión y robustez. La validación garantiza un impacto sobre la calidad del laboratorio en la emisión confiable de resultados para el analito en estudio, además de nuevas investigaciones que surjan respecto al CBD.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Introducción al Cannabidiol (CBD) y los Cannabinoides de la *Cannabis sativa*.

La *Cannabis sativa* es considerada una de las especies más antiguas cultivadas por la humanidad, con una historia que se remonta a al menos 12,000 años, era utilizaba tanto con fines medicinales como recreativos al final de la última Edad de Hielo. Su origen se sitúa en Asia Central, cerca del macizo de Altái. En China, hace unos 4,700 años, el cannabis ya era valorado como una hierba medicinal importante. Entre el 1500 y el 200 a. C., su uso con fines terapéuticos se extendió a India, Egipto y Grecia. Para 1894, en el Reino Unido, se reconocían los beneficios de las semillas de cáñamo en dosis moderadas. Sin embargo, debido a los efectos psicoactivos de algunos de sus componentes, su uso fue prohibido tanto en el Reino Unido como en Estados Unidos entre las décadas de 1920 y 1930. En años recientes, los estudios sobre esta planta han llevado a que, en 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconozca sus propiedades medicinales, afirmando además que el cannabis no genera dependencia [7].

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

2.1.1 Caracterización general de la planta *Cannabis sativa* y sus metabolitos principales.

La *Cannabis sativa* es una planta angiosperma herbácea anual que puede alcanzar alturas de hasta 4 metros. En el año de 1753, Carl Linneaus, clasificó por primera vez la planta de *Cannabis sativa* L; mientras que en 1785 Jean Baptiste Lamarck identificó una nueva especie, a la que llamó *C. indica*. En la actualidad, el Jardín Botánico de Missouri reconoce 13 especies, que incluyen a *C. sativa* y *C. indica*, así como a: *C. americana*, *C. chinensis*, *C. erratica*, *C. faetens*, *C. generalis*, *C. gigantea*, *C. intersita*, *C. kafiristanica*, *C. lupulus*, *C. macrosperma* y *C. ruderalis*, además de varias variedades de *C. sativa* y *C. indica* [8], [9].

La tabla 2.1. resume las características taxonómicas de la planta de *Cannabis sativa* [10].

Tabla 2.1. Taxonomía de la Planta

Clasificación taxonómica	Descripción
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Género	Cannabis
Especie	<i>Cannabis sativa</i>
Variedad	<i>Cannabis sativa</i> , <i>Cannabis indica</i> , <i>Cannabis ruderalis</i>

La planta de cannabis es una especie dioica; es decir, se tiene individuos macho e individuos hembra; las flores del individuo macho se caracterizan por la generación

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

del polen que posteriormente al cruce con la especie hembra dan origen a las semillas de la planta. Las flores del individuo hembra sin polinizar producen una alta cantidad glándulas de reserva llamadas tricomas, estas estructuras segregan la resina que contiene a los metabolitos naturales de interés medicinal [7].

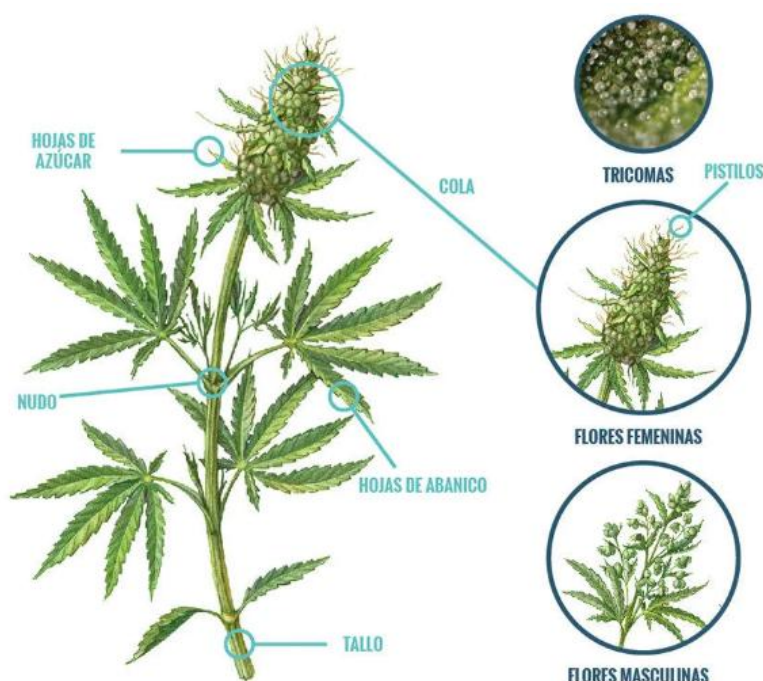


Figura 2.1 Anatomía de la planta [11]

La composición química de la *Cannabis sativa* ha sido objeto de extensos estudios; en la resina se han identificado aproximadamente 500 compuestos, incluyendo cannabinoides, terpenos, flavonoides, alcaloides, estilbenos, amidas fenólicas, lignanamidas y lípidos. Los metabolitos naturales que destacan son los cannabinoides y terpenos por estar en mayor proporción con respecto a los demás metabolitos, además de ser la fuente medicinal en efecto sequito [8]. Los cannabinoides o fitocannabinoides constituyen un grupo de compuestos que presentan una estructura terpenofenólica característica de C₂₁, son liposolubles y

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

se pueden clasificar en 11 subclases, que incluyen: cannabícromeno (CBC), cannabidiol (CBD), canabielsoin (CBE), cannabigerol (CBG), cannabiciolol (CBL), cannabinol (CBN), cannabinodiol (CBND), cannabitrilol (CBT), Δ^8 -trans-tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 -trans-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y cannabinoides de tipo misceláneo [12],[13]. Según un estudio más de 560 constituyentes han sido identificados en la planta de cannabis [14].

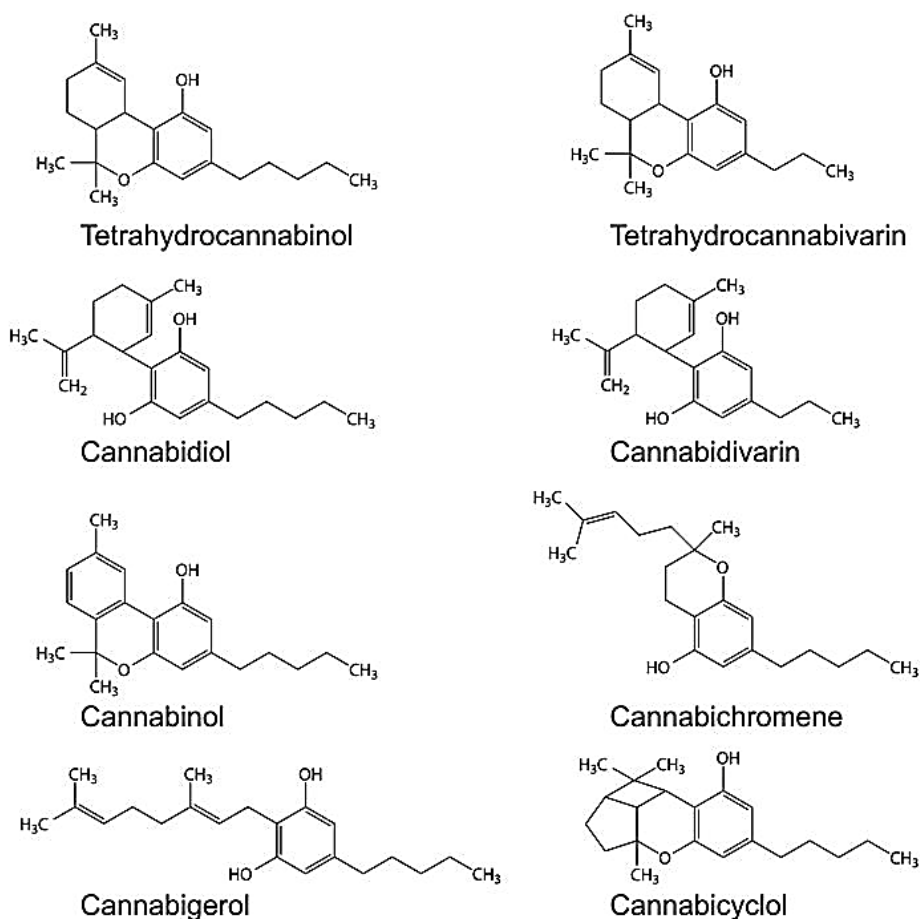


Figura 2.2 Estructura de los principales cannabinoides [15]

De este grupo de cannabinoides los más estudiados y sobre los cuales ha recaído el mayor interés investigativo desde un punto de vista terapéutico son: CBD (no psicoactivo) y THC (psicoactivo). En la planta fresca, los cannabinoides se

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

sintetizan y acumulan como ácidos canabinoideos, los cuales se descarboxilan gradualmente durante el proceso de secado, almacenamiento, o al suministrar calentamiento, activando la molécula hacia su forma final. Es decir, en la inflorescencia fresca y seca se encuentran las formas ácidas como el ácido cannabidiólico (CBDA) o el ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) lo mismo sucede para el resto de cannabinoides, el limitante de estas formas ácidas es que en su mayoría carecen de actividad terapéutica [14], y por ello, al someter a la inflorescencia a procesos oxidativos naturales o calentamiento a temperaturas superiores a 110°C se logra la descarboxilación de ácido y se transforma en una molécula activa [16].

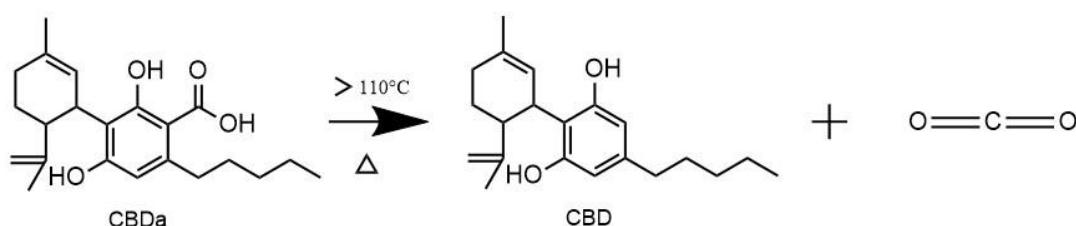


Figura 2.3 Mecanismo de descarboxilación CBDA a CBD

2.1.2 Propiedades, importancia y aplicaciones terapéuticas del CBD

El CBD es uno de los principales fitocannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L, puede representar hasta el hasta el 40% del extracto de la planta dependiendo naturalmente de la cepa de origen. Como compuesto bioactivo, el Cannabidiol (CBD) ha captado la atención de la comunidad médica por sus notables efectos terapéuticos y su seguridad, al no generar efecto psicoactivo o alteraciones psicológicas; la evidencia científica sostiene su eficacia en el abordaje de diferentes patologías, incluyendo trastornos del sistema nervioso, enfermedades del sistema cardiovascular y condiciones de dolor crónico [17]. La tabla 2.2 resume los principales atributos medicinales de este fitocanabinoide [17],[18].

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 2.2 Propiedades Terapéuticas del CBD

Propiedad terapéutica	Beneficios	Condiciones asociadas
Antiinflamatoria	Reduce la inflamación crónica, alivia el dolor	Artritis, enfermedades inflamatorias intestinales, fibromialgia
Analgésica	Alivia el dolor crónico y agudo	Dolor neuropático, dolor muscular, migrañas
Ansiolítica	Reduce la ansiedad y el estrés	Trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de estrés postraumático, trastorno obsesivo-compulsivo
Neuroprotectora	Protege las células nerviosas	Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple
Anticonvulsivante	Reduce la frecuencia e intensidad de las convulsiones	Epilepsia
Antipsicótica	Puede ser útil en el tratamiento de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos	Esquizofrenia, psicosis
Antioxidante	Protege las células del daño causado por los radicales libres	Envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas
Antiemético	Reducción de náusea, control de vómito, regulación gastrointestinal	Náuseas crónicas, trastornos digestivos
Conciliación del sueño	Ayuda a tratar el insomnio y mejorar la calidad del sueño	Insomnio, trastornos del sueño relacionados con el estrés
Inmunomodulador	Balance inflamatorio, regulación del sistema inmune	Enfermedades autoinmunes, alergias

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Se han realizado investigaciones extensas sobre los efectos biológicos del CBD, incluyendo sus interacciones con los receptores cannabinoides y otros componentes del sistema endocannabinoide. Se ha evaluado su potencial terapéutico en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y metabólicas, las cuales a menudo se relacionan con procesos de estrés oxidativo e inflamación. Uno de los usos más investigados del CBD es su capacidad terapéutica en la diabetes y sus complicaciones, tanto en modelos animales como en estudios clínicos con humanos [18],[13].

2.2. Importancia del Análisis de Cannabinoides en Inflorescencias

2.2.1 Relevancia de las inflorescencias como fuente de extracción de cannabinoides.

Las inflorescencias de la planta de cannabis son fundamentales para la extracción del contenido metabólico de interés, debido a la alta concentración de compuestos activos, almacenados en forma de resina en unas glándulas de tejido basal vegetal llamadas tricomas; estas estructuras alojan alta concentración de cannabinoides como THC, CBD y otros cannabinoides. Además de los cannabinoides, las inflorescencias también son ricas en terpenos (compuestos responsables del aroma) y flavonoides (antioxidantes). Estos compuestos no solo potencian los efectos terapéuticos de los cannabinoides, sino que también contribuyen al efecto séquito, donde la combinación de cannabinoides y terpenos puede aumentar la eficacia terapéutica general [7].

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

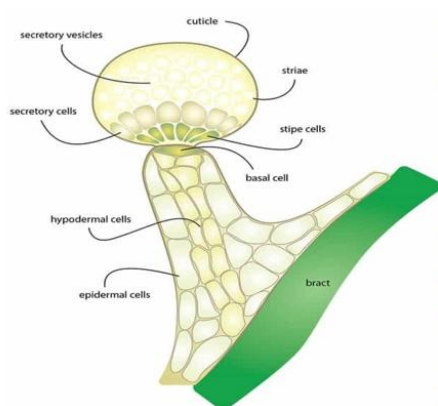


Figura 2.4 Estructura de los tricomas

La genética de la planta tiene un papel significativo en la cantidad y el tipo de cannabinoides que se encuentran en las flores. Algunas cepas de cannabis se cultivan de manera específica para aumentar la concentración de determinados cannabinoides, como el CBD en las variedades medicinales, o para lograr altos niveles de THC en las plantas psicoactivas, la evaluación de las características organolépticas y fisicoquímicas (como humedad y perfil de tricomas) es fundamental para seleccionar las mejores inflorescencias para la extracción. Las flores de cannabis son fundamentales para elaborar productos concentrados, como aceites, extractos y resinas; estos productos presentan una mayor concentración de cannabinoides y proporcionan una forma más efectiva de administración, ideal para pacientes que necesitan dosis precisas y elevadas de estos compuestos.

2.2.2 Importancia del control de calidad en productos derivados del CBD y su impacto en la industria de la salud y farmacéutica.

El auge en la popularidad del CBD ha impulsado una expansión en la disponibilidad de productos, destacando a su vez la importancia de implementar estrictos estándares de calidad. La manufactura de productos derivados de la *Cannabis sativa* a partir de la resina extraída ha sido sujetos de controles de calidad y evaluación de la eficacia en los tratamientos fitoterapéuticos. Estos productos

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

dependen en gran medida de la estandarización de sus formulaciones; un control riguroso de los principios activos, propiedades físicas y químicas, y perfiles fitoquímicos son fundamentales para garantizar la consistencia y seguridad de estos productos, con el fin de asegurar su aceptación en la práctica médica actual. La importancia en un control de calidad sólido radica principalmente en la seguridad del consumidor; los productos de CBD deben estar exentos de contaminantes como: pesticidas, metales pesados y otros agentes que pueden ser dañinos para la salud. Además, el control de calidad asegura que los productos contengan la cantidad de CBD declarada en la etiqueta y otros compuestos bioactivos en las proporciones adecuadas para maximizar los beneficios terapéuticos; garantizar que los productos cumplan con las regulaciones y estándares de calidad establecidos por las autoridades sanitarias y constituir una imagen positiva de la industria del CBD, basada en la transparencia y la calidad [19].

Garantizar un adecuado control a los productos finales conllevaría una integración global del CBD en la medicina convencional; permitiría el desarrollo de nuevos tratamientos y terapias; forjaría un vínculo más cercano entre la industria de cannabis medicinal y las farmacéuticas, desembocando en el desarrollo de nuevos medicamentos; además, sumaría una mayor confianza por parte de los profesionales de la salud para recomendar productos de CBD a sus pacientes cuando saben que cumplen con los estándares de calidad requeridos según lo establecido por las normativas.

2.3. Métodos de Análisis para la Cuantificación de CBD

Garantizar la calidad del extracto, también implica un tratamiento analítico esencial que pueda dar una información veraz y concisa del contenido metabólico de la flor y sus derivados. Por ello, es necesario conocer la metodología analítica que recae sobre estos productos para garantizar la calidad del extracto.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

2.3.1 Métodos tradicionales de análisis de cannabinoides y sus limitaciones.

Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Es una técnica de separación basada en la adsorción diferencial de los analitos sobre una fase estacionaria que normalmente constituye una placa de sílica gel, mientras que la fase móvil es una mezcla de solventes orgánicos. Esta técnica es aplicada exclusivamente para determinaciones cualitativas; dentro de sus limitaciones están: resolución limitada para la separación de cannabinoides similares; interferencias de la matriz; baja sensibilidad y difícil cuantificación precisa [20].

Cromatografía de Gases (GC)

Este método se basa en la separación por volatilidad y afinidad con la fase estacionaria, presenta una alta resolución para compuestos volátiles, la fase móvil constituye una mezcla de gases que no reaccionan ni con el analito ni con la fase estacionaria y puede acoplarse a diversos detectores (FID, ECD, MS). En determinación de cannabinoides presenta las siguientes limitaciones: no puede detectar las formas ácidas debido a la descarboxilación que ocurre a altas temperaturas por degradación térmica parcial o total de compuestos; requiere la derivatización de cannabinoides ácidos; no se sugiere su uso para cannabinoides termolábiles, se requiere una descarboxilación previa del cannabinoide ácido a analizar, además, que estima largos tiempos de análisis [20], [21].

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Espectrofotometría UV-Visible

El método se fundamenta en la absorción de luz UV-Visible al incidir sobre la molécula, es un método simple, rápido y de bajo costo, pero con limitaciones para cannabinoides como: interferencias significativas en la matriz; baja selectividad; difícil distinción entre cannabinoides individuales y precisión variable para análisis cuantitativo [22].

Métodos Colorimétricos

Su fundamento implica reacciones químicas específicas usando como indicativo un cambio de color, la principal ventaja de estos métodos es la facilidad de ser implementados. Entre sus desventajas para análisis de cannabinoides están: baja especificidad, interferencias con otros compuestos orgánicos, resultados subjetivos y el uso exclusivo para análisis cualitativos y semi-cuantitativos [3].

2.3.2 Ventajas de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) frente a otras técnicas analíticas.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Esta técnica es una de las más utilizadas para la separación, identificación y cuantificación de cannabinoides. Gracias a su versatilidad permite analizar amplia variedad de compuestos orgánicos incluyendo los cannabinoides no volátiles; la separación de los componentes de una mezcla se da en una columna (fase estacionaria), arrastrados por la fase móvil (mezcla de solventes orgánicos) y su detección a través de distintos tipos de detectores específicos [23].

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Dentro de las ventajas considerables para usar este método en la cuantificación de cannabinoides están:

- Capacidad para cuantificar cannabinoides en su forma ácida (CBDA, THCA) y en su forma activa (CBD y THC) sin la necesidad de una derivatización previa [24].
- Permite obtener un perfil completo de los cannabinoides presentes en la muestra permitiendo su cuantificación simultánea en tiempos cortos.
- Minimiza la degradación térmica de los analitos a cuantificar, lo que garantiza que los cannabinoides sean analizados de una manera precisa y proporcionando resultados más representativos [24].
- A diferencia de la cromatografía de gases que no es suficientemente selectiva presenta mayor sensibilidad y especificidad.
- Se puede ajustar para distintos tipos de muestras y condiciones analíticas, lo que la convierte en una herramienta ideal para diversas aplicaciones en el análisis de cannabis tanto para extractos como para productos comestibles [24].

2.4. Fundamentos de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC/DAD).

2.4.1 Principios y funcionamiento de HPLC y DAD.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) junto con la Detección por Arreglo de Diodos (DAD) es una técnica analítica potente y muy utilizada para la separación y cuantificación de diversos compuestos. Esta técnica funciona separando los componentes de una mezcla en función de sus interacciones con una fase estacionaria y una fase móvil, mientras que el DAD permite la detección

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

simultánea de analitos en varias longitudes de onda, lo que aumenta la sensibilidad y especificidad del análisis.

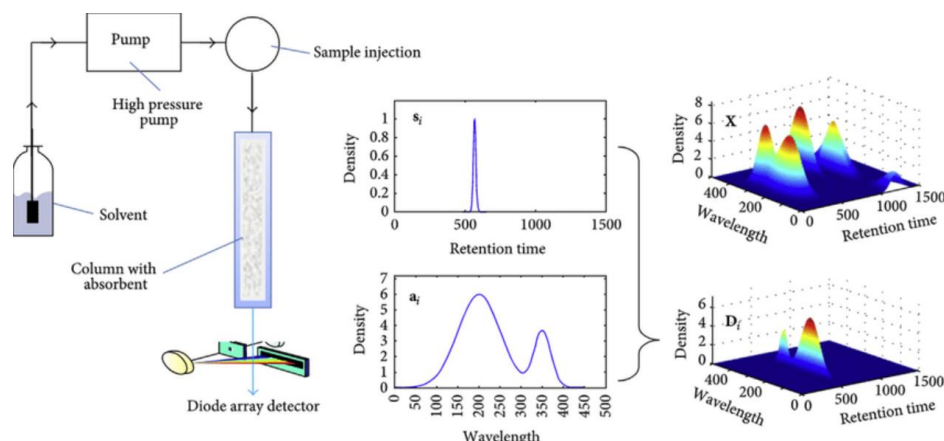


Figura 2.5 Mecanismo de funcionamiento del HPLC-DAD [25]

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD) permite separar analitos en picos dentro de un cromatograma y obtener espectros de todos los compuestos en las regiones ultravioleta y visible. El DAD capta los espectros de los picos a lo largo de un rango de longitudes de onda de forma simultánea, esto permite evaluar la pureza de los picos espectrales y también identificar compuestos desconocidos. La cromatografía HPLC-DAD ofrece información diagnóstica sobre sustancias farmacológicas y posibles impurezas de degradación; las variaciones en la absorción máxima ($\lambda_{\max}$) pueden brindar datos importantes sobre los cambios estructurales ocurridos durante un proceso de degradación. Además de identificar picos, el DAD verifica la pureza de los mismos, permitiendo detectar la posible coelución de otros compuestos, como excipientes y adyuvantes [25].

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

2.4.2 Aplicación del método HPLC/DAD para la identificación y cuantificación de cannabinoides.

Esta técnica se ha consolidado como el método predilecto para el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de cannabinoides. Este tipo de cromatografía es capaz de distinguir, identificar y cuantificar simultáneamente las formas ácidas y neutras de cannabinoides como THC, CBD, CBN, CBG, THCA y CBDA, lo que resulta fundamental para un análisis completo. El HPLC-DAD ofrece resultados cuantitativos precisos gracias a su capacidad para medir la absorbancia en longitudes de onda específicas. Cada cannabinoide posee un perfil único de absorción UV, lo que facilita la determinación de su concentración en la muestra. Investigaciones recientes han demostrado que este método puede identificar hasta 10 cannabinoides en menos de 7 minutos, lo que optimiza considerablemente la eficiencia en los laboratorios [26].

2.5. Conceptos y Criterios de Validación de Métodos Analítico.

2.5.1 Definición y propósito de la validación de métodos analíticos en el contexto de control de calidad.

Validar un método analítico consiste en establecer objetivos en base a criterios específicos para confirmar que el método a aplicar o desarrollado cumple con los requisitos necesarios para su posterior uso en análisis rutinarios para un analito específico. Esto implica, evaluar su desempeño y asegurar que es adecuado para el propósito analítico, con el fin de asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos en un laboratorio. Este proceso demanda una evaluación exhaustiva del método, desde su diseño hasta su implementación, cuyo enfoque es garantizar que cumple con los parámetros específicos de calidad para su aplicación [27].

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

La validación debe realizarse para métodos desarrollados por el laboratorio, métodos no normalizados y modificaciones de métodos normalizados a través del cumplimiento de las características de desempeño que establecen las normas.

2.5.2 Parámetros de validación según la norma AOAC 2018.10.

La norma establece las siguientes características de desempeño o parámetros de validación:

Selectividad: corresponde a la capacidad para medir un analito particular en presencia de otros componentes de la muestra, sin que estos interfieran en su detección. Dicho de otro modo, un método altamente selectivo es aquel que permite diferenciar claramente el analito de interés de otros compuestos similares presentes en la misma matriz [27].

Límite de detección (LOD):

Según la Guía de laboratorio para validación de métodos EURAQUEM define al LOD como la mínima concentración del analito que puede ser detectada por el método a un nivel específico de confianza [27].

Límite de cuantificación (LOQ)

La Guía EURAQUEM define al LOQ como el nivel mínimo nivel de analito en el cual las condiciones de desempeño para la aplicación del método son aceptables. Puede también ser entendido como la cantidad mínima de analito en la muestra posible de cuantificar con veracidad y precisión [27].

Linealidad

Es la capacidad del método para emitir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango definido. Se determina

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

mediante el análisis de regresión, la evaluación del coeficiente de correlación, la evaluación de residuales, y el análisis del intercepto y la pendiente [27].

Precisión

Indica el grado de concordancia entre resultados obtenidos en diferentes ensayos realizados bajo las mismas condiciones. Se suele expresar como desviación estándar (SD) o coeficiente de variación (CV), se evalúa a través de tres formas: repetibilidad, repetibilidad intermedia y reproducibilidad [27].

- ***Repetibilidad:*** corresponde a la evaluación de la precisión bajo condiciones del aplicar el mismo método, sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo analista y usando el mismo equipamiento.
- ***Repetibilidad Intermedia:*** Corresponde a la evaluación de la precisión bajo condiciones donde los resultados se obtienen mediante el uso del mismo método, en el mismo laboratorio (intralaboratorio), pero en distintos días, analistas, condiciones ambientales.
- ***Reproducibilidad:*** Corresponde a la evaluación de la precisión bajo la aplicación del método sobre la misma muestra en diferentes laboratorios (interlaboratorios), con distintos operadores y diferente equipamiento.

Exactitud

Indica el grado de concordancia entre los resultados de un método y un valor de referencia certificado aceptado, por convención, como verdadero. Es decir, expresa la proximidad de un resultado al valor verdadero expresado como error o sesgo; puede ser evaluado por comparación con un material de referencia certificado (CMR); por recuperación de adiciones conocidas mediante fortificación de muestra; comparando métodos de referencia o a través de ensayos interlaboratorio.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Robustez

Es una medida de la habilidad del método para mantenerse constante frente a pequeñas, pero intencionadas, variaciones en sus parámetros. Esto indica la confiabilidad del método durante su uso habitual [27].

2.6. Normativas y Guías para la Validación de Métodos Analíticos en Laboratorios de Química

2.6.1 Revisión de la normativa AOAC 2018.10 y su aplicación en la validación de métodos para análisis de cannabinoides.

La norma AOAC 2018.10 describe un método estandarizado para la cuantificación de cannabinoides en flores secas y productos de cannabis, específicamente diseñado para asegurar la precisión y la veracidad en los resultados analíticos. Su objetivo principal es proporcionar un método robusto y validado para la determinación de cannabinoides como el CBD, THC y otros en diversas matrices, incluyendo inflorescencias, aceites y otros productos derivados del cannabis.

La norma evalúa los parámetros de desempeño anteriormente definidos como: selectividad, LOD, LOQ, precisión, exactitud, linealidad y robustez. Como método analítico utiliza la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD), lo que permite la separación y cuantificación precisa de cannabinoides. Es aplicable a una variedad de productos de cannabis, lo que lo hace versátil para su uso en laboratorios de control de calidad y en investigaciones científicas [28].

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

2.6.2 Importancia del cumplimiento normativo para la acreditación y competitividad analítica en laboratorios.

La norma AOAC 2018.10 es considerada como un marco de referencia esencial para garantizar la calidad y fiabilidad en los resultados, al proporcionar un conjunto de criterios y procedimientos detallados para la validación de métodos analíticos de distintos cannabinoides. El cumplimiento de parámetros normados en los laboratorios contribuye a asegurar resultados precisos, confiables, con trazabilidad en las mediciones, ayuda a la mejora continua de procesos y a la diferenciación en competencia analítica con otros laboratorios. Su implementación no solo mejora el control de calidad en la industria del cannabis, sino que también apoya el avance del conocimiento científico en este campo en crecimiento constante.

2.7. Implicaciones de la Validación de Métodos para la Cuantificación de CBD en la Investigación, la Industria y rol de la validación en el fortalecimiento de la competencia analítica de los laboratorios de investigación.

El impacto de un método que aporte resultados confiables beneficia al laboratorio tanto a nivel industrial como a la investigación que surja respecto al analito en cuestión. La validación promueve a los laboratorios evaluar y ajustar sus métodos analíticos, asegurando resultados precisos y confiables.

En el ámbito industrial, el análisis de CBD en inflorescencias proporcionarían una descripción precisa del contenido de cannabinoides, lo que garantiza la calidad y potencia de los productos derivados antes de su comercialización. Un laboratorio de control de calidad que disponga de un método analítico validado para cuantificar CBD contribuiría al desarrollo e investigación de diferentes productos, como aceites, comestibles y tópicos, asegurando que los cannabinoides se midan adecuadamente durante todo el proceso. Permitiría a las empresas operar dentro

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

del marco legal establecido por las autoridades competentes, garantizando así la seguridad y calidad de sus productos o servicios.

En laboratorios de investigación facilitaría estudios sobre la composición química del cannabis, permitiendo a los investigadores obtener datos precisos sobre los perfiles cannabinoides, sus efectos potenciales en la salud e investigaciones sobre actividad farmacológica, además de cumplir altos estándares de calidad en las investigaciones y asegurar que los datos generados sean válidos.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo experimental aplicada. Se describe como aplicada al buscar resolver un problema práctico: la validación de un método analítico para la cuantificación de CBD en inflorescencias de *Cannabis sativa*. Es experimental, al llevarse a cabo en condiciones controladas de laboratorio para evaluar la eficacia y precisión del método. Además, se enmarca en un nivel explicativo, ya que pretende identificar causas y efectos relacionados con la cuantificación de CBD; de igual manera, busca verificar la robustez y fiabilidad del método propuesto.

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño de investigación es experimental, este diseño resultó adecuado porque permitió el control y la manipulación de variables en un entorno de laboratorio, lo que aseguró que los resultados obtenidos sean precisos y replicables. Se estructuró mediante ensayos controlados en los que se evaluaron parámetros específicos como selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, veracidad, precisión y robustez del método analítico.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

3.2. Metodología

3.2.1 Variables

- **Variable independiente:** Las condiciones de ensayo y los parámetros del método HPLC/DAD.
- **Variable dependiente:** La concentración de Cannabidiol (CBD) cuantificada en las inflorescencias de *Cannabis sativa*.

3.2.2 Diseño experimental

El diseño experimental incluye los siguientes pasos:

1. Preparación de muestras: Extracción de CBD de las inflorescencias de *Cannabis sativa* mediante técnicas estándar de laboratorio.
2. Desarrollo del método HPLC/DAD: Ajuste y optimización de los parámetros del HPLC/DAD para asegurar la selectividad y sensibilidad adecuadas para la cuantificación de CBD.
3. Validación del método: Realización de ensayos en diferentes condiciones para evaluar la precisión, exactitud, linealidad, límites de detección y cuantificación, especificidad y robustez del método.
4. Análisis de datos: Interpretación de los resultados obtenidos durante los ensayos para verificar el cumplimiento de los criterios de validación establecidos por la norma AOAC 2018.10.
5. Documentación y reporte: Registro detallado de los procedimientos, resultados y conclusiones para garantizar la transparencia y reproducibilidad de la investigación.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

3.3. Recolección de datos

3.3.1 Métodos y técnicas

3.3.1.1 Procedimiento para la cuantificación de CBD en inflorescencias.

Para el desarrollo del método para la determinación del contenido de CBD en inflorescencias, se tomó como referencia el Single-Laboratory Validation, First Action de la norma AOAC 2018.10 y otras condiciones obtenidas de bibliografía para optimizar el método según la necesidad y recursos del laboratorio.

a. Preparación de la muestra

Las muestras de trabajo fueron obtenidas por compra a empresas licenciatarias (Ecuannabis médica) que cuentan con el permiso legal para expendio de esta materia prima, según la reglamentación actual que rige en el Ecuador. Además, de donaciones de flor de otras empresas para el desarrollo de esta investigación.

Para el tratamiento de la muestra, se tomó aproximadamente 5 g de inflorescencias secas de la *Cannabis sativa* y mediante un molino de hierbas eléctrico por 30 segundos, se redujo el tamaño de partícula. De la flor molida y homogenizada, se pesó 200 mg de masa en un tubo falcon de 50 ml y se añadió 20 ml de una solución de metanol al 80%; posteriormente con la ayuda de un vortex a velocidad constante se mezcló por 30 segundos y la extracción se realizó por 15 min en un baño de ultrasonido, para finalmente volver a mezclar con el vórtex, se filtró el extracto con filtro de jeringa de 0,2 μm y se realizó la dilución adecuada para medir. El diagrama de flujo (Ver figura 3.1) describe de forma resumida el tratamiento de las inflorescencias para la extracción del analito de interés.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

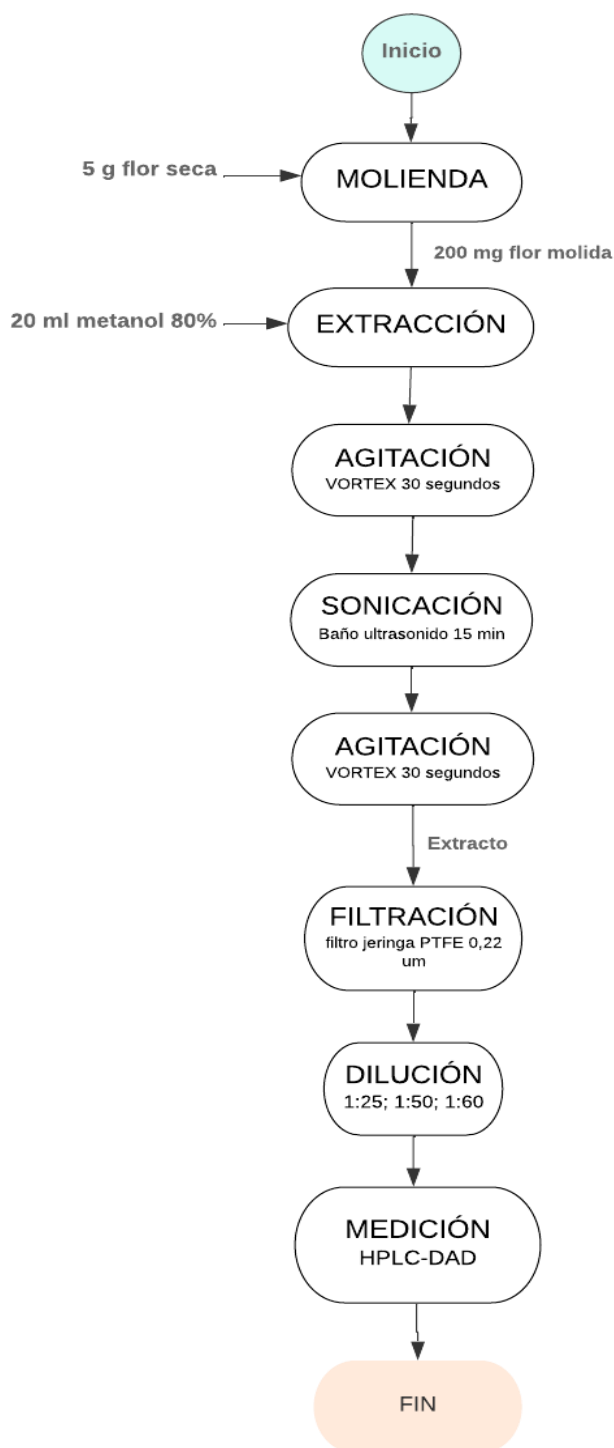


Figura 3.1 Diagrama de flujo de la preparación de muestra

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

b. Preparación de Soluciones estándar para la curva de calibración

A partir del estándar CBD de trabajo de pureza conocida, se preparó 100 ml de una solución madre de 1000 ppm en metanol puro; de la solución madre se prepararon 2 diluciones intermedias de 10 y 100 ppm en 50 ml, aforado con metanol puro. La preparación de los patrones para la curva de calibración de 1 ppm a 30 ppm se llevó a cabo mediante dilución de las soluciones intermedias en viales ámbar de 1,5 ml considerando las cantidades detalladas en la tabla 3.1

Tabla 3.1 Preparación de soluciones estándar

Estándar objetivo (ppm)	V aforo (ml)	Solución intermedia de uso (ppm)	V solución intermedia (µl)	V metanol (µl)
1	1	10	100	900
2,5	1	10	250	750
5	1	10	500	500
15	1	100	150	850
20	1	100	200	800
25	1	100	250	750
30	1	100	300	700

NOTA: Volúmenes de patrones intermedios para la preparación de estándares de la curva de calibración

c. Condiciones cromatográficas

El desarrollo del método cromatográfico se llevó a cabo mediante diversas pruebas preliminares, considerando condiciones y parámetros de la referencia bibliográfica de sustento, así como recursos y reactivos disponibles en el laboratorio. La evaluación de la selectividad del método para garantizar la separación única del pico del analito de interés fue el paso fundamental de punto de partida para la

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

cuantificación de CBD con el fin de establecer las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 3.2. Estas pruebas se realizaron tanto para el estándar de trabajo como para una muestra aleatoria.

Tabla 3.2 Condiciones cromatográficas para determinación de CBD

Parámetro	Descripción
Fase móvil	Metanol: acetonitrilo: agua 60: 30: 10
Flujo	0,5 ml / min
Inyección	10 µl
Longitud de onda	274 nm
Temperatura de la columna	23 ° C
Elución	Isocrática

d. Validación del método

Con el método desarrollado, ajustado y probado se procedió a establecer los parámetros de calidad analítica que implementa la norma AOAC 2018.10 y se los evaluó con el apoyo de la Guía de laboratorio para la validación de métodos Eurachem garantizando así, la veracidad y precisión en los resultados. La validación se realizó para el intervalo de $(12,5 - 125) \frac{mg\ CBD}{g\ inflorescencia}$, la tabla 3.3 detalla la evaluación de cada uno de los parámetros de calidad establecidos experimentalmente.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 3.3 Diseño experimental de validación

CRITERIO	EVALUACIÓN	ENSAYO
Selectividad/ Especificidad	Se realizó un barrido espectral en la región ultravioleta (200-400 nm) de una muestra diluida, una muestra fortificada y un patrón de baja concentración. El objetivo fue determinar la absorción de una longitud de onda específica (274 nm) para cuantificar el CBD y comparar los resultados con cromatogramas del HPLC, asegurando la identificación del analito. Ver figura 7 y 8.	3 réplicas
LOD	Medidas de blanco de solvente fortificado con baja concentración de analito (Curva a baja concentración 0.250-1ppm con 5 puntos) LOD: $3 \times So'$ * LOQ: $10 \times So'$ *	4 réplicas por punto de la curva Puntos de calibración (0.250, 0.30, 0.50, 0.60, 0.75, 1)
LOQ		
Linealidad	12.5 mg/g - 125 mg/g	3 curvas por 3 días con 2 réplicas por punto de concentración del patrón. Se corren 6 puntos de calibración más un blanco. Puntos de calibración: (2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0)
Precisión	Bajo: 12.5 mg/g Alto: 125 mg/g	Repetibilidad: Analista 1: medir 5 muestras de rutina en el nivel bajo y 5 muestras de rutina en el nivel alto. Precisión intermedia: Analista 1: medir 5 muestras de rutina en el nivel bajo y 5 muestras de rutina en el nivel alto por 2 días. Analista 2: medir 5 muestras de rutina en el nivel bajo y nivel alto por 1 día.
Exactitud	Bajo: 12.5 mg/g Alto: 125 mg/g	Fortificación de muestras herbales con el estándar de trabajo a concentraciones de 12.5 mg/g y 125 mg/g con 5 réplicas. Análisis de recuperación
Robustez	Evaluar variaciones de método	8 ensayos con 5 parámetros (pH, T columna, fase móvil, flujo, volumen de inyección)
CURVA DE TRABAJO	Cuantificación de CBD en inflorescencias	1 ppm a 30 ppm

NOTA: Evaluación de los parámetros de validación y detalle de la fórmula So'

* $So' = 3 So/C$; So = desviación estándar de la curva de calibración a mínimas concentraciones

C = concentración (pendiente) de la curva de calibración a mínimas concentraciones.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

e. Procedimiento experimental para cada parámetro de validación

Selectividad

El barrido espectral realizado y descrito anteriormente se efectuó sobre un patrón de 1 ppm preparado a partir de la solución de 1000 ppm; sobre una muestra cuya preparación consistió en llevar a 25 ml de aforo con metanol puro, 300 µl de extracto de la inflorescencia y sobre una muestra fortificada con 250 µl de patrón de 100 ppm. Se cotejaron los espectros de absorción con los cromatogramas de la corrida en HPLC estableciendo así, que la señal o el pico corresponde al del analito en la corrida; se aceptó una resolución $\geq 1,5$ calculado a través de la siguiente fórmula:

$$R_{AB} = \frac{t_{rB} - t_{rA}}{0,5 (w_B + w_A)}$$

t_{ri} = tiempo de retención del componente i

w_i = área del pico del componente i

Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Se realizó una curva de calibración a mínimas concentraciones en viales de 1,5 ml y aforados a 1 ml con metanol puro. Los puntos establecidos para las 4 réplicas fueron: 0.250, 0.30, 0.50, 0.60, 0.75, 1 ppm siguiendo el procedimiento de preparación por diluciones similar al descrito en la tabla 10. La determinación de estos dos parámetros se basó en un análisis de regresión de la curva a mínimas concentraciones ($A=Cx+b$) y aplicando las fórmulas:

$$LOD = \frac{3.3 S_o}{c}$$

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

$$LOQ = \frac{10 S_0}{c}$$

Finalizando por expresar los parámetros en mg/g y estableciendo un promedio de las réplicas realizadas tanto para el LOD como para el LOQ.

Linealidad

Se realizó el análisis de regresión para las curvas a día seguido, considerando un nivel de confianza del 95%. El intervalo normal de trabajo fue de 2.5 ppm a 25 ppm, para mejorar la calidad se usa la curva de calibración con 2 puntos adicionales por debajo del mínimo valor y encima del máximo descrito anteriormente como curva de trabajo de 1 ppm a 30 ppm. Los análisis se reportan por día de curva de calibración.

Precisión

Evaluated como repetibilidad y precisión intermedia. Para la repetibilidad se prepararon 5 muestras de un mismo lote próximas al nivel bajo de concentración y 5 muestras de un mismo lote próximas al nivel alto, se siguió el procedimiento descrito en la figura 3.1 para su análisis. El mismo tratamiento de muestra se utilizó para evaluar precisión intermedia por 3 días y sumado un analista, a dos niveles con 5 muestras próximas al nivel bajo de CBD y 5 muestras próximas al nivel alto de analito.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Exactitud

Se evaluó a través del porcentaje de recuperación promedio de las 5 réplicas realizadas a muestras fortificadas con el patrón de 1000 ppm a nivel bajo (12,5 mg/g) y a nivel alto (125 mg/g). Este tratamiento se realizó sobre una matriz herbal con características similares a las muestras de rutina problema, pero libre del analito y siguiendo el tratamiento de muestra descrito anteriormente.

Robustez

Para definir si el método está sujeto a variación, se aplicó la matriz de Youden Steiner (ver tabla 3.4) que describe 8 ensayos variando 5 parámetros (ver tabla 3.5) con el criterio de $(X_{\max} - x_{\min}) < \sqrt{2}SD$, donde SD corresponde a la desviación estándar del nivel alto.

Tabla 3.4 Matriz Youden Steiner

ítem	ANÁLISIS							
asignación	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
	s	t	u	v	w	x	y	z

Nota: Esta matriz describe el número de ensayos a realizar con la variación de los parámetros seleccionados, según la guía de validación de métodos del Instituto de Salud pública de Chile [29]

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 3.5 Parámetros de variación para evaluar robustez

Asignación	Parámetros	valor bajo	valor alto
A,a	V inyección (ul)	9	11
B,b	longitud de onda (nm)	270	280
C,c	flujo (ml/min)	0,45	0,55
D,d	fase móvil (metoh:acn:agua)	58:28:14	62:32:06
E,e	T columna (°C)	20	25

Las fórmulas a continuación describen la forma de cálculo para el promedio de los valores levantados por cada ítem variado a nivel bajo y nivel alto según la matriz de Youden Steiner.

$$A = \frac{s + t + u + v}{4} = \frac{4A}{4} = A$$

$$a = \frac{w + x + y + z}{4} = \frac{4a}{4} = a$$

La robustez del método es establecida según el siguiente criterio [29]:

Si $(X \text{ max} - x \text{ min}) < \sqrt{2}SD$ entonces el método no es sensible a variación

Si $(X \text{ max} - x \text{ min}) > \sqrt{2}SD$ entonces el método es sensible a variación

La ejecución de los parámetros de calidad analítica se llevó a cabo a través del cumplimiento de objetivos planteados para cada criterio como se detalla en la tabla 3.6.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 3.6 Objetivos de Validación

CRITERIO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Selectividad/ Especificidad	Determinar que la señal obtenida corresponde al CBD en matriz de inflorescencia. Comparar barrido espectral de una muestra fortificada y no fortificada mediante absorción uv. Comparar cromatogramas de una muestra fortificada y no fortificada mediante cromatografía líquida de alta resolución para establecer la señal correspondiente al CBD, resolución $\geq 1,5$.
LOD	$3 S_{o'} *$
LOQ	$\leq 1.25 \text{ mg/g}$
Linealidad	Ecuación lineal: $y=mx+b$ $R^2 \geq 0,995$ Intervalo: $12.5 \text{ mg/g} - 125 \text{ mg/g}$
Exactitud	Recuperación: Nivel bajo (12.5 mg/g): $90 - 110\%$ Nivel alto (125 mg/g): $90 - 110\%$
Precisión	Nivel Bajo (12.5 mg/g): $RSDr\% \leq 5 \text{ } RSDi\% \leq 7$ Nivel alto (125 mg/g): $RSDr\% \leq 5 \text{ } RSDi\% \leq 7$
Robustez	Aplicar matriz Youden y Steiner variando 5 parámetros $(X_{\text{max}} - x_{\text{min}}) < \sqrt{2SD}$

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

3.4. Recursos

3.4.1 Equipamiento

Tabla 3.7 Materiales

Material	Descripción
Matraces aforados	50 ml, 100 ml
Viales con tapa y septum	1,5 ml HPLC
Puntas de micropipeta	20 µl a 1000 µl
Filtro de Jeringa	0,22 µm PTFE
Tubos Falcon	50 ml
Pesa filtro	50/10 aprox 30 ml
Vasos de precipitación	50 ml, 100 ml, 250 ml

Tabla 3.8 Reactivos

Reactivo	Pureza	Marca
Metanol Grado HPLC	99,9%	Pharmco by Greenfield Global
Acetonitrilo Grado HPLC	99,9%	Merck®
Agua	Desionizada	N/A

Tabla 3.9 Estándar

Estándar working	Pureza	Marca
CBD ISOLATE-HN106CBD	98,39%	Hemp nectar importado por Corporación de estudios y desarrollo cannabis medicinal Ecuador Mayu S.A.S

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 3.10 Equipos

Equipo	Descripción
HPLC con detector DAD	Marca: Thermoscientific Modelo: Ultimate 3000 series Flujo max: 50 ml/min Presión max: modo isocrático 9000 psi Columna: Thermoscientific Hypersil Gold, C18, Dim (mm): 150x4.6, Tamaño de partícula (μ): 5
Micropipetas	Marca: Thermoscientific Medidas: $20 \pm 0,36\mu\text{l}$ a $200 \pm 1,2\mu\text{l}$ $100 \pm 1\mu\text{l}$ a $1000 \pm 6\mu\text{l}$
Baño de ultrasonido	Marca: Branson Modelo: 2510
Balanza analítica	Marca: Kern Modelo: AEJ 200 Max: 200 g
Vortex	Marca: Thermoscientific Velocidad: 200 a 3000 rpm

3.5. Análisis Estadístico

La estadística aplicada en la presente validación es de tipo descriptiva, ya que permite un análisis resumido de la información que contienen los datos levantados a través de medidas de tendencia central como la media o promedio; medidas de dispersión como desviación estándar expresada como coeficiente de variación. Asimismo, emplea conceptos estadísticos inferenciales para contrastar hipótesis en el análisis de varianza, con el objetivo de verificar la veracidad de ciertas

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

afirmaciones. Facilita la estimación de correlaciones lineales, análisis de regresión y la realización de pruebas de hipótesis, utilizando el estadístico F de Fisher como criterio de decisión para inferir características de la población a partir de la muestra. El análisis estadístico se realizó con apoyo de la función “Análisis de datos” del programa Microsoft Excel 2019 sumado la descripción de fórmulas específicas aplicadas para cada criterio de validación.

En parámetros como límites de cuantificación y detección, así como linealidad se aplicó análisis de regresión lineal para determinar errores típicos, correlación lineal y promedio en las réplicas.

Para la precisión en términos de repetibilidad y repetibilidad intermedia se procedió así:

- Repetibilidad

El tratamiento estadístico de los datos levantados para este parámetro se realizó a través de la determinación del promedio, desviación estándar y el cálculo del coeficiente de variación (%RSDr) tanto al nivel bajo 2,5 mg/g como para el nivel alto 125 mg/g.

- Repetibilidad Intermedia

Dado que se realizó a distintos días y con una analista adicional la estadística de los datos consistió en el cálculo del coeficiente de variación para la repetibilidad intermedia %RSDi al nivel alto y al nivel bajo según las fórmulas descritas a continuación:

$$\%RSD_i = \frac{s_i}{\bar{x}}$$

$$s_i = \sqrt{V_i}$$

$$V_i = V_L + DCMW$$

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

$$V_L = \frac{(DCMB - DCMW)}{p}$$

s_i = desviación estándar precisión intermedia

V_i = Varianza intermedia

V_L = Varianza intralaboratorio

$DCMW$ = Diferencia promedia de cuadrados dentro de grupos (Varianza de repetibilidad)

$DCMB$ = Diferencia promedia de cuadrados entre grupos (Varianza de reproducibilidad)

p = tamaño de grupo

Tanto el parámetro $DCMW$ como $DCMB$ resultan del análisis ANOVA que reporta el programa Excel al realizar el tratamiento de datos con un nivel de confianza del 95%, como criterio de aceptación se considera la H_0 .

La prueba de hipótesis aplicada tanto al nivel bajo como al nivel alto:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2; \text{ si } F_{\text{calculada}} < F_{\text{crítica}}$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2; \text{ si } F_{\text{calculada}} > F_{\text{crítica}}$$

H_0 : describe que no existe diferencia significativa en las medias de los grupos.

H_1 : describe que al menos una presenta diferencia significativa en las medias de los grupos.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

Los resultados reportados corresponden al tratamiento de datos levantados durante el proceso experimental con el fin de obtener un método que permita cuantificar el contenido de CBD en inflorescencias a través de la técnica instrumental HPLC-DAD, con la confianza y veracidad que dictaminan los parámetros de calidad analítica.

4.1. Desarrollo de la metodología para la validación CBD en inflorescencias de la *Cannabis sativa*

El desarrollo de la metodología inició a partir de diversas pruebas preliminares bajo la técnica del conocimiento heurístico de la prueba y error. En primera instancia, se identificó un estándar de trabajo de pureza conocida detallado en la tabla 3.9, a partir del cual se realizó diversos ensayos con el propósito de establecer condiciones óptimas de análisis por HPLC-DAD para luego poner a prueba sobre muestras y lograr la adecuada separación de analito de estudio. Se seleccionó una fase móvil descrita por la bibliografía, según Ibañez [1], variando de 52: 30: 18 MetOH: Acn:H₂O hasta 60:30: 10 de la misma composición con elución isocrática y longitud de onda de 220nm. La composición de la fase móvil resultó un referente de partida, así como la longitud de onda que posteriormente se modificó al realizar un barrido espectral según lo descrito en el estudio de selectividad. Las condiciones principales que variaron durante las pruebas realizadas fueron: longitud de onda, volumen de inyección, flujo, temperatura de columna y tiempo de corrida. La descripción de las distintas pruebas realizadas hasta la optimización del método se describe a continuación:

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

PRUEBA 1

La prueba inicia seleccionando un patrón de 5 ppm de CBD preparado previamente, la fase móvil usada corresponde a metanol, acetonitrilo, agua 60:30:10, la longitud de onda de 220 nm, el volumen de inyección 5 µl, la temperatura de la columna 20°C, el flujo de 1ml/ min y el tiempo de corrida de 20 min. La figura 4.1 muestra el cromatograma de esta prueba, donde se observa el pico del estándar eluyendo junto al frente de solvente con una pobre separación, baja resolución y con un tiempo de retención de 2,75 min por lo que se procedió a realizar una nueva prueba modificando otras condiciones con el fin de mejorar la separación.

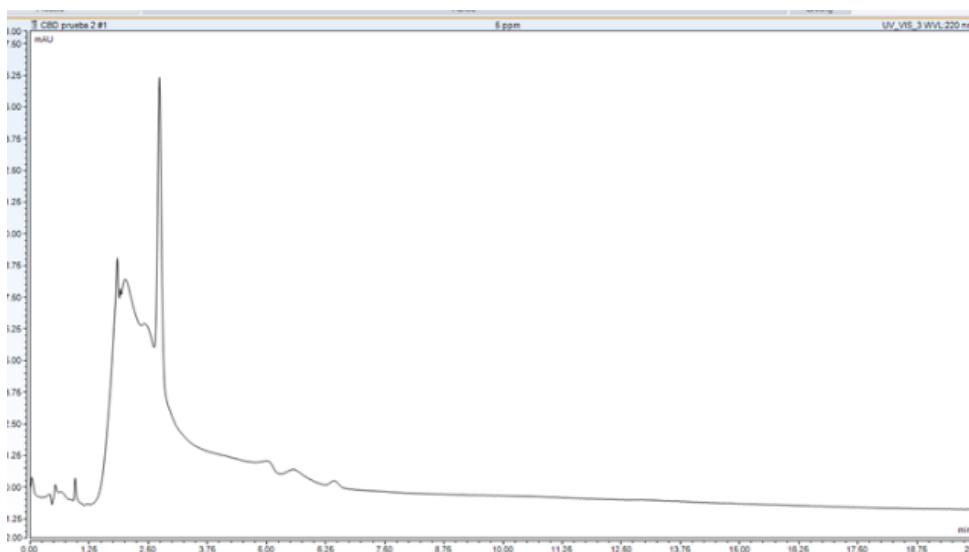


Figura 4.1 Prueba 1 patrón 5 ppm de CBD

PRUEBA 2

Para esta prueba se inició con el estudio de selectividad al realizar el barrido espectral entre 200-400 nm sobre el patrón de 1 ppm, una muestra fortificada y una no fortificada como se muestran en las figuras A1, A2 y A3 de anexos. Se seleccionó como longitud de onda analítica 274 nm y se establecieron las siguientes condiciones cromatográficas sobre un estándar a disposición de 10 ppm con el fin de mejorar la resolución. Se mantuvo la composición de la fase móvil; para mejorar

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

la interacción del analito con la fase estacionaria el flujo se redujo a 0,5 ml/min, con la finalidad de aumentar el tiempo de retención y mejorar la separación de compuestos que eluyen cerca; la T de la columna se elevó a 23°C; el volumen de inyección se incrementó a 10 µl y el tiempo de corrida se mantuvo en 20 min. La figura 4.2 muestra el cromatograma resultante de esta prueba donde se observa el pico del analito totalmente resuelto superando la resolución objetivo de 1,5 con tiempo de retención de 5,550 minutos.

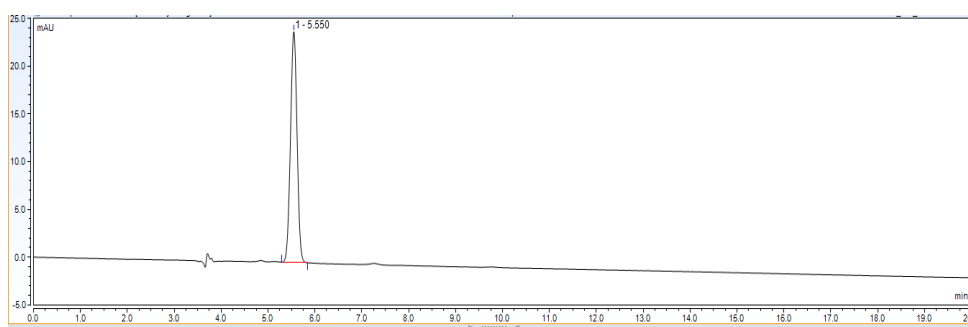


Figura 4.2 Prueba 2 patrón 10 ppm de CBD

PRUEBA 3

Esta prueba consistió en un ensayo sobre una muestra aleatoria fortificada con los parámetros establecidos en la prueba 2 para la identificación del pico correspondiente al CBD. La figura 4.3 muestra el pico resuelto de analito a un tiempo de 5.5 min.

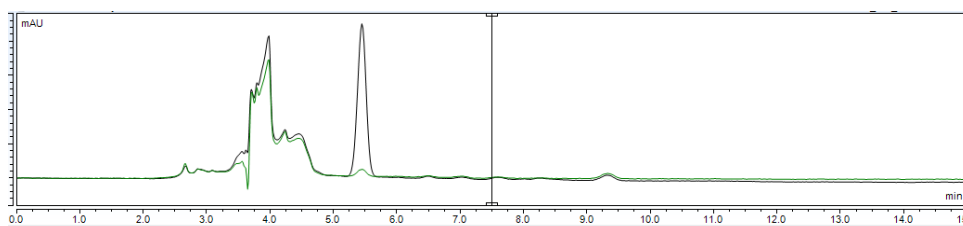


Figura 4.3 Prueba 3 muestra fortificada de CBD

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Si bien, esta prueba demostró ser efectiva para identificar y separar el analito, por condiciones técnicas se tuvo que realizar un cambio en la columna, lo que obligó a reestablecer las nuevas condiciones cromatográficas óptimas en función de la nueva columna.

PRUEBA 4

Con el objetivo de optimizar el análisis y reducir costos, se llevó a cabo una prueba empleando la nueva columna, un patrón de 5 ppm y un tiempo de corrida más corto (10 min), con las condiciones cromatográficas de la prueba 2. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 4.4, revelaron que el pico del CBD eluyó a 4,12 minutos, demostrando la eficacia de las nuevas condiciones cromatográficas.

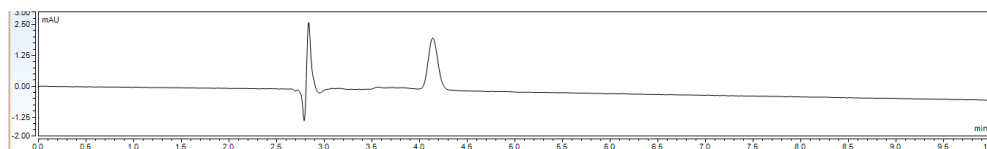


Figura 4.4 Prueba 4 patrón 5 ppm de CBD

PRUEBA 5

Se realizó un ensayo sobre una muestra con la nueva columna y las condiciones detalladas a continuación: T columna 23°C; Inyección: 10 µl; flujo: 0,5 ml/min; fase móvil: (metanol 60: acetonitrilo 30: agua: 10) y corrida 10 min. Esta prueba refleja un resultado determinante que permitió aceptar el método con las condiciones cromatográficas descritas.

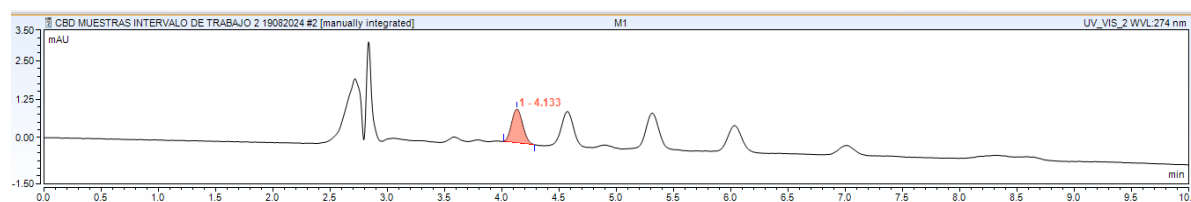


Figura 4.5 Prueba 5 muestra aleatoria

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

La figura 4.6 representa de forma resumida la metodología para determinar y validar CBD en flores de cannabis por cromatografía líquida de alta resolución.

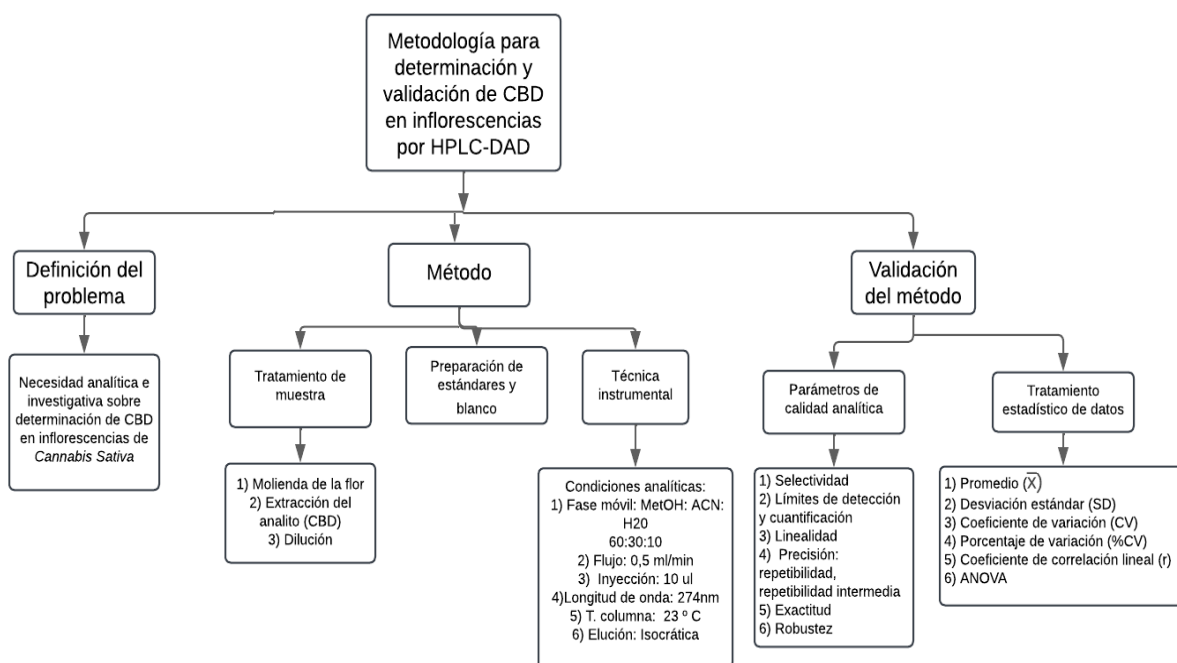


Figura 4.6 Metodología para la validación de CBD

4.2. Resultados de la validación.

4.2.1 Selectividad

La determinación del tiempo de retención del CBD y la longitud de onda del analito para definir interferencia y establecer la señal única del componente de interés, se realizó a través del análisis por triplicado del patrón de 1 ppm, una muestra y la misma fortificada con un patrón de 100 ppm, llegando a establecer una longitud de onda de 274 nm, un tiempo de retención de 4,12 min y una resolución mayor a 1,5, los resultados se reportan en la tabla 4.1. Las figuras A1, A2, A3, A4, A5, A6 de anexos muestran los barridos espectrales y cromatogramas de la primera réplica

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

de los ensayos realizados sobre la muestra y el patrón donde se observa la separación única del analito de interés.

Tabla 4.1 Resultados de resolución en evaluación de selectividad

RÉPLICA	PATRÓN					MUESTRA SIN FORTIFICAR					MUESTRA FORTIFICADA				
	t_{rA}	t_{rB}	w_A	w_B	Resol	t_{rA}	t_{rB}	w_A	w_B	Resol	t_{rA}	t_{rB}	w_A	w_B	Resol
1	0	4,140	0,0434	0	190,78	4,144	5,120	0,1024	0,0106	17,27	4,125	5,065	0,8677	0,0130	2,13
2	0	4,123	0,0487	0	169,32	4,142	5,117	0,1027	0,0131	17,10	4,125	5,062	0,8866	0,0119	2,09
3	0	4,143	0,0378	0	219,20	4,138	5,111	0,1023	0,0112	17,15	4,123	5,041	0,8781	0,0121	2,06
			PROMEDIO		193,10			PROMEDIO		17,17			PROMEDIO		2,09

Según lo que reporta la tabla 4.1 para el patrón de 1 ppm se describe una resolución alta de 193,10 esto debido a la señal única y propia del estándar de alta pureza donde no hay un pico adicional con el que se pueda realizar una comparación. A diferencia de la muestra sin fortificar y la muestra fortificada que detallan valores de 17,11 y 2,09 respectivamente comparados con el pico adyacente al pico del analito que permitió esta comparación.

4.2.2 Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

La determinación de estos parámetros se realizó a partir de una curva a bajas concentraciones de analitos a partir del estándar de trabajo, es decir, fortificando el blanco de solvente que fue el medio extractante. La curva se realizó mediante 4 réplicas usando niveles de concentración de: 0,25 ppm; 0,30 ppm; 0,50 ppm; 0,60 ppm; 0,75 ppm; y 1 ppm. Se realizó el análisis de regresión con el fin de obtener el error típico S_o y la pendiente C como muestra la tabla 4.2 y, a través de las fórmulas para LOD, LOQ expresando en mg/g se obtuvieron los resultados de la tabla 4.3.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.2 Error típico y pendiente

RÉPLICA	So	C
1	0,000296	0,037506
2	0,000566	0,035016
3	0,001052	0,042209
4	0,000870	0,041548

Nota: Estos valores se generan del análisis de regresión lineal a partir de Microsoft Excel

Tabla 4.3 Valores de LOD y LOQ del método

RÉPLICA	LOD (mg/g)	LOQ (mg/g)
1	0,130	0,395
2	0,267	0,809
3	0,411	1,247
4	0,346	1,048
PROMEDIO	0,289	0,875

4.2.3 Linealidad

Este parámetro se evaluó a través de la elaboración de curvas diarias estableciendo una correlación superior a 0,995. La tabla 4.4 muestra el índice de correlación lineal de las curvas por día, además de los errores tanto para las pendientes (m) como para el intercepto (b).

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.4 Estadística para las curvas de calibración por día

Curvas de calibración	m	b	r²	Sm	Sb
Curva Día 1	0,04047	0,00571	0,99939	0,00024	0,00387
Curva Día 2	0,04131	0,02484	0,99771	0,00048	0,00765
Curva Día 3	0,04424	-0,00150	0,99912	0,00032	0,00508

4.2.4 Precisión

La precisión se evaluó a través de la repetibilidad y la repetibilidad intermedia para los niveles bajo y alto de concentración según lo establecido en el diseño experimental.

Repetibilidad

Las tablas 4.5 y 4.6 muestran los resultados en mg/g de las réplicas realizadas por cada nivel, además, del porcentaje de variación que cumple con el valor del objetivo planteado según el diseño de validación.

Tabla 4.5 Resultados de precisión evaluado como repetibilidad a nivel bajo

RÉPLICA	C (mg/g)
1	12,984
2	13,099
3	13,139
4	12,732
5	13,216
PROMEDIO	13,034
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,189
%RSDr	1,446

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.6 Resultados de precisión evaluado como repetibilidad a nivel alto

RÉPLICA	C (mg/g)
1	110,368
2	106,521
3	115,721
4	119,445
5	118,038
PROMEDIO	114,019
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	5,432
%RSDr	4,764

Precisión intermedia

Las tablas 4.7 y 4.10 muestran los resultados en mg/g de las réplicas realizadas por cada nivel en 3 distintos días; además, del porcentaje de variación intermedia por cada nivel de concentración reportados en las tablas 4.9 y 4.11.

Tabla 4.7 Datos levantados para evaluación de precisión intermedia a nivel bajo

NIVEL BAJO (mg/g)	Día 1 (Analista 1)	Día 2 (Analista 1)	Día 3 (Analista 2)
12,5	13,348	13,750	13,575
	12,813	13,240	13,706
	13,418	13,312	13,996
	13,785	12,851	13,789
	12,800	13,856	12,628

NOTA: Datos obtenidos para la evaluación de la precisión intermedia

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.8 Datos de los grupos

Número de grupos	k	3
Tamaño de grupo	p	5
Grados de libertad	v	p-1

NOTA: Datos para los cálculos de la precisión intermedia tanto par nivel bajo como para alto

Tabla 4.9 Resultados de precisión evaluado como precisión intermedia a nivel bajo

Promedio	DCMW	Sr	%RSDr	DCMB	VL	Vi	Si	%RSDi
13,39	0,209	0,457	3,420	0,117	0,000	0,209	0,457	3,420

NOTA: Condicional (Si, VL es negativo, el valor se considera cero)

Tabla 4.10 Datos levantados para evaluación de precisión intermedia a nivel alto

NIVEL ALTO	Día 1	Día 2	Día 3
(mg/g)	(Analista 1)	(Analista 1)	(Analista 2)
125	117,989	118,541	118,813
	117,099	114,988	115,400
	115,549	116,832	109,056
	116,480	114,845	117,763
	118,360	117,908	103,248

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.11 Resultados de precisión evaluado como precisión intermedia a nivel alto

Promedio	DCMW	Sr	%RSDr	DCMB	VL	Vi	Si	%RSDi
115,520	15,764	3,970	3,440	26,990	2,245	18,009	4,244	3,67

NOTA: Condicional (Si, VL es negativo, el valor se considera cero)

4.2.5 Exactitud

La evaluación de este parámetro se realizó a través del porcentaje de recuperación tanto para el nivel bajo, como para el nivel alto de concentración fortificada. Las tablas 4.12 y la 4.14 muestran los datos levantados de recuperación para cada réplica por cada nivel respectivamente; las tablas 4.13 y 4.15 muestran el promedio de concentración fortificada obtenido de las réplicas con el porcentaje de recuperación final para cada nivel.

Tabla 4.12 Datos para evaluación de exactitud como recuperación a nivel bajo

MUESTRA	C final (mg/g)	% RECUPERACIÓN
1	11,749	93,994
2	12,030	96,245
3	11,301	90,415
4	12,029	96,236
5	11,365	90,924

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.13 Resultados de recuperación a nivel bajo

NIVEL BAJO	
FORTIFICACIÓN	12,5 mg/g
PROMEDIO	11,695
SD	0,350
% CV	2,994
% Recuperación	93,56

Tabla 4.14 Datos para evaluación de exactitud como recuperación a nivel alto

MUESTRA	C final (mg/g)	%RECUPERACIÓN
1	121,433	97,146
2	123,169	98,535
3	132,094	105,675
4	120,567	96,453
5	122,378	97,903

Tabla 4.15 Resultados de recuperación a nivel alto

NIVEL ALTO	
FORTIFICACIÓN	125 mg/g
PROMEDIO	123,930
SD	4,669
%CV	3,767
% Recuperación	99,14

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

4.2.6 Robustez

La evaluación de robustez implicó 8 ensayos variando distintos parámetros según la matriz de Youden Steiner; la tabla 4.16 muestra los resultados levantados de dichas variaciones. Dado que los resultados de las variaciones se aproximaron al nivel alto de concentración, se utilizó la desviación de ese nivel de concentración para poder evaluar la robustez con los datos de la tabla 4.17.

Según los datos detallados en la tabla 4.18 el método desarrollado es sensible a variaciones.

Tabla 4.16 Datos levantados para evaluación de robustez

ítem	ANÁLISIS							
asignación	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
	s	t	u	v	w	x	y	z
	62,619	170,567	55,966	64,166	87,311	108,411	257,032	87,326

Tabla 4.17 Datos de desviación estándar a nivel alto para evaluación de robustez

SD nivel alto	5,432
√2 DS	7,682

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.18 Resultados de la evaluación de robustez

Condición Variable		Resultados		Diferencia	COMPARACIÓN
Valor Alto	Valor bajo x	Promedio X (mg/g)	Promedio x (mg/g)	X-x	(X-x) < $\sqrt{2}$ DS
X					
A	a	88,329	135,020	46,691	sensible a variación
B	b	107,227	116,122	8,896	sensible a variación
C	c	115,732	107,617	8,115	sensible a variación
D	d	144,386	78,964	65,422	sensible a variación
E	e	78,580	144,769	66,189	sensible a variación

4.3. Evaluación de resultados.

Los resultados se evaluaron de acuerdo al cumplimiento de los objetivos de validación planteados previamente en la tabla 3.6 y ejecutados de manera experimental al haber seguido la metodología desarrollada. La tabla 4.19 resume los resultados de cada uno de los parámetros de calidad analítica.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Tabla 4.19 Resultados de los parámetros de validación

CRITERIO	RESULTADOS
SELECTIVIDAD	Resolución > 1,5
LOD	0,29 mg/g
LOQ	0,87 mg/g
LINEALIDAD	Día 1: $r^2 = 0,999$; Día 2: $r^2 = 0,998$ Día 3: $r^2 = 0,999$
PRECISIÓN	NIVEL BAJO
	%RSDr: 1,45
	%RSDi: 3,42
	NIVEL ALTO
	% RSDr: 4,76
	%RSDi: 3,67
EXACTITUD	%Recuperación (Nivel bajo): 93,56% % Recuperación (Nivel alto): 99,14%
ROBUSTEZ	El método es sensible a variaciones.

Nota: La tabla está en función del cumplimiento de los objetivos

Según los datos reportados, el método desarrollado da cumplimiento a los objetivos planteados; estos objetivos se establecieron siguiendo como referencia el Single-Laboratory Validation, First Action de la norma AOAC 2018.10 y el Single-laboratory validation study, first action 2018.11. Al realizar una comparativa general por parámetro según lo que establece la norma y el método actualmente desarrollado se tiene que para todos los casos; la selectividad del método se corroboró mediante el análisis de materiales de referencia y muestras reales. La resolución

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

cromatográfica, evaluada a 274 nm, superó el valor límite de 1,5 establecido por las normas de la AOAC, lo que confirma la capacidad del método para separar el analito de interés (CBD) de otras sustancias presentes en la matriz; es necesario destacar que la metodología establecida por la norma antes mencionada permite disgregar 10 cannabinoides simultáneamente en una corrida cromatográfica y por ello una menor longitud de onda de absorción (220nm), donde la mayoría de fitocannabinoides pueden ser analizados, además del uso de una solución buffer que favorece la activación de los cromóforos propios de cada molécula. El método propuesto durante esta investigación disgregó únicamente el CBD eligiendo una longitud de onda mayor para la identificación única y selectiva de dicha molécula sin la necesidad de la adición de una solución amortiguadora.

Fraguas-Sánchez *et al.* [30], para el estudio de la estabilidad de extractos de cannabis durante la validación del CBD por HPLC:DAD, establecen condiciones cromatográficas a una longitud de onda de 228 nm fijando los siguientes parámetros: solución de ácido acético en una fase móvil de MetOH: ACN: agua (52:30:18), su elución fue modo isocrático, con un flujo de 1,8 ml/min e inyección de 20 µl. Para el intervalo de validación de 1 a 150 µg/ml este estudio reportó: LOD Y LOQ de 0,2 µg/ml y 0,7 µg/ml respectivamente, con un coeficiente de correlación lineal de 0,993, un coeficiente de variación a un solo nivel de 1.2% y una recuperación de 100,4%; al comparar con lo que se reporta en la tabla 4.19 se destaca el valor del coeficiente de variación, que muestra una mejor repetibilidad y un ensayo sesgado con una mayor recuperación. A este ensayo se recomendaría realizar el estudio a 2 niveles, con las mismas condiciones para poder evaluar diferencias significativas entre métodos.

Finalmente, la robustez es un parámetro que permite definir si el método es sensible a cambios al realizar ciertas variaciones en condiciones controladas; durante la experimentación se determinó que los cambios realizados sobre las condiciones cromatográficas generan modificaciones al método haciéndolo vulnerable a

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

cambios; por lo que la validación es efectiva únicamente para el laboratorio de Química Médica. En el siguiente capítulo se detallan recomendaciones para mejorar la robustez del método y que sea reproducible en otros laboratorios de investigación.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se desarrolló un método para la determinación de CBD en inflorescencias de la *Cannabis sativa* por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos en el laboratorio de Química Médica de la Universidad del Azuay; la aplicación del método por HPLC/DAD para la identificación de este cannabinoide ha permitido satisfacer los parámetros calidad analítica gracias a su rapidez, precisión y versatilidad permitiendo obtener resultados confiables, cuyo cumplimiento es fundamental para garantizar el éxito a largo plazo y la credibilidad en el laboratorio de investigación.

Se diseñó un plan de validación según los parámetros de calidad referidos por la norma AOAC 2018.10, estableciendo y cumpliendo los objetivos propuestos en el diseño de validación.

La evaluación de los parámetros de calidad analítica se dio en función del cumplimiento de objetivos de validación, obteniendo los siguientes resultados por cada criterio: selectividad con resolución $> 1,5$; LOD con un valor de 0,29 mg/g; LOQ resultó 0,87 mg/g; la linealidad analizada por día reportó los siguientes coeficientes de correlación: Día 1: $r^2 = 0,999$; Día 2: $r^2 = 0,998$ Día 3: $r^2 = 0,999$; en cuanto a precisión para el nivel bajo de concentración evaluado se obtuvo un %RSDr: 1,45 y un %RSDi de 3,42; la precisión, para el nivel alto de concentración evaluado presentó un %RSDr: 4,76 y %RSDi: 3,67; la recuperación para nivel bajo

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

fue 93,56% y para el nivel alto resultó 99,14%; finalmente la robustez reportó cambios significativos a las variaciones.

Recomendaciones

Durante el análisis de datos, a lo largo de la parte experimental y al comparar con referencias bibliográficas, si se busca un método lo suficientemente robusto, para poder ser reproducido en distintos laboratorios, con una mejora en el coeficiente de variación y en el porcentaje de recuperación se recomienda:

- Realizar una evaluación sobre las condiciones cromatográficas modificadas; analizar los resultados obtenidos, identificar los parámetros que generan la mayor variación, optimizar nuevamente los parámetros y volver a validar el método.
- Se recomienda utilizar una solución amortiguadora que permita mantener un pH constante en el sistema e influir sobre la capacidad de un cromóforo para absorber la luz a una determinada longitud de onda, en caso de validar más de un cannabinoide.
- Para elevar la confianza en este parámetro se recomienda a su vez; evaluar mediante trazabilidad documental y mediante un control más estricto el mantenimiento de equipos instrumentales.

Dado que los cannabinoides se encuentran en sus formas ácidas en la flor seca, se recomienda la validación de esta forma (CBDA) con el fin de realizar un estimado y predecir con mayor exactitud la cantidad de CBD que se generará tras la descarboxilación. Esto es fundamental para el control de calidad, la dosificación y la investigación.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Referencias

Referencias Bibliográficas

- [1] Ibañez Paola, “Estudio para la determinación de Cannabidiol (CBD), aplicación a la determinación de plantas de Cannabis,” Universidad de Valladolid, Castilla y León, 2021.
- [2] L. Vaclavik *et al.*, “Quantitation of cannabinoids in cannabis dried plant materials, concentrates, and oils using liquid chromatography-diode array detection technique with optional mass spectrometric detection: Single-laboratory validation study, first action 2018.11,” *J AOAC Int*, vol. 102, no. 6, pp. 1822–1833, 2019, doi: 10.5740/jaoacint.18-0426.
- [3] United Nations Office on Drugs and Crime., *Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis : manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes*, Naciones Unidas. New York, 2014.
- [4] R. Deidda *et al.*, “The analysis of cannabinoids in cannabis samples by supercritical fluid chromatography and ultra-high-performance liquid chromatography: A comparison study,” *Analytical Science Advances*, vol. 2, no. 1–2, pp. 2–14, Feb. 2021, doi: 10.1002/ansa.202000091.
- [5] A. Q. Ahmed, D. Noshad, and P. C. H. Li, “Quantification of Cannabinoids in Cultivars of Cannabis sp. by Gas Chromatography–Mass Spectrometry,” *Chromatographia*, vol. 84, no. 8, pp. 711–717, Aug. 2021, doi: 10.1007/s10337-021-04060-9.
- [6] A. S. C. L. Dantas *et al.*, “DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CANABINOIDES EM PRODUTOS À BASE DE

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT- 21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

- CANNABIS PARA FINS MEDICINAIS,” *Quim Nova*, vol. 46, no. 3, pp. 282–289, 2023, doi: 10.21577/0100-4042.20230001.
- [7] M. Backes, *La Farmacia Cannábica*, vol. 1. Buenos Aires: Pampa Books, 2014.
- [8] G. E. Ángeles López, F. Brindis, S. Cristians Niizawa, R. Ventura Martínez, D. Guadalupe, and E. Ángeles López, “Cannabis sativa L., una planta singular,” *Rev Mex Cienc Farm*, vol. 45, no. 4, p. 2014, 2014.
- [9] E. B. Russo, “REVIEW History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet,” 2007.
- [10] G. E. Ángeles López, F. Brindis, S. Cristians Niizawa, R. Ventura Martínez, D. Guadalupe, and E. Ángeles López, “REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS.”
- [11] Zamnesia, “Anatomía de la Planta de Cannabis.” Accessed: Jan. 02, 2025. [Online]. Available: <https://www.zamnesia.es/cultivar-marihuana/446-anatomia-planta-de-cannabis>
- [12] M. M. Radwan, S. Chandra, S. Gul, and M. A. Elsohly, “Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis,” 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules26092774.
- [13] F. Grotenhermen, “Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids,” 2003. doi: <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>.
- [14] M. A. ElSohly, M. M. Radwan, W. Gul, S. Chandra, and A. Galal, “Phytochemistry of Cannabis sativa L,” Jan. 01, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9_1.
- [15] Cantabria labs-Stangest, “Cannabis y Cannabinoides,” Valls, 2021. Accessed: Jan. 02, 2025. [Online]. Available: <https://www.cronicare.es/es/articulos-tecnicos/item/11-cannabis-y-cannabinoides>

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

- [16] J. W. Kratz and M. Garcia De Palau, *Manual sobre Cannabis Medicinal*, vol. 1. Barcelona: Kalapa Clinic S.L., 2018.
- [17] J. M. Nichols and B. L. F. Kaplan, "Immune Responses Regulated by Cannabidiol," *Cannabis Cannabinoid Res*, vol. 5, no. 1, pp. 12–31, Mar. 2020, doi: 10.1089/can.2018.0073.
- [18] S. Atalay, I. Jarocka-karpowicz, and E. Skrzydlewska, "Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol," Jan. 01, 2020, *MDPI*. doi: 10.3390/antiox9010021.
- [19] V. Espinoza-González *et al.*, "Importancia de la certificación de los fármacos cannabinoides," *Latin american journal of clinical sciences and medical technology*, vol. 3, no. 1, pp. 118–127, Aug. 2021, doi: 10.34141/LJCS9921095.
- [20] United Nations Office on Drugs and Crime, "Métodos recomendados para la identificación y el análisis de los agonistas de los receptores de cannabinoides sintéticos en los materiales incautados," New York, 2014.
- [21] Martínez-Galdaméz ME, "Detección e identificación de cannabinoides sintéticos en muestras sólidas y biológicas," 2019, doi: 10.4321/S1887-85712019000100003.
- [22] A. Hazekamp, A. Peltenburg, R. Verpoorte, and C. Giroud, "Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from Cannabis sativa L.," *J Liq Chromatogr Relat Technol*, vol. 28, no. 15, pp. 2361–2382, 2005, doi: 10.1080/10826070500187558.
- [23] United Nations office on drugs and crime, *Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products : manual for use by national drug analysis laboratories*. New York: United Nations, 2009.
- [24] M. Wang *et al.*, "Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry," *Cannabis*

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT- 21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Cannabinoid Res, vol. 1, no. 1, pp. 262–271, Jan. 2016, doi: 10.1089/can.2016.0020.

- [25] Y. L. Chew, M. A. Khor, and Y. Y. Lim, “Choices of chromatographic methods as stability indicating assays for pharmaceutical products: A review,” Mar. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06553.
- [26] B. De Backer *et al.*, “Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material,” *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 877, no. 32, pp. 4115–4124, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.11.004.
- [27] Eurolab España. P.P Morillas y colaboradores, *Guía Eurachem: La Adecuación al uso de métodos analíticos. Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*, Primera. Eurachem, 2016.
- [28] E. M. Mudge and P. N. Brown, “Determination of cannabinoids in cannabis sativa dried flowers and oils by LC-UV: Single-laboratory validation, first action 2018.10,” *J AOAC Int*, vol. 103, no. 2, pp. 489–493, 2021, doi: 10.5740/jaoacint.19-0197.
- [29] B. Duffau *et al.*, *GUÍA TÉCNICA N ° 1. Aspectos Generales sobre la Validación de métodos*. Santiago, 2010.
- [30] A. I. Fraguas-Sánchez, A. Fernández-Carballido, C. Martín-Sabroso, and A. I. Torres-Suárez, “Stability characteristics of cannabidiol for the design of pharmacological, biochemical and pharmaceutical studies,” *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 1150, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122188.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Apéndices y anexos

Apéndice A: Estudio de Selectividad

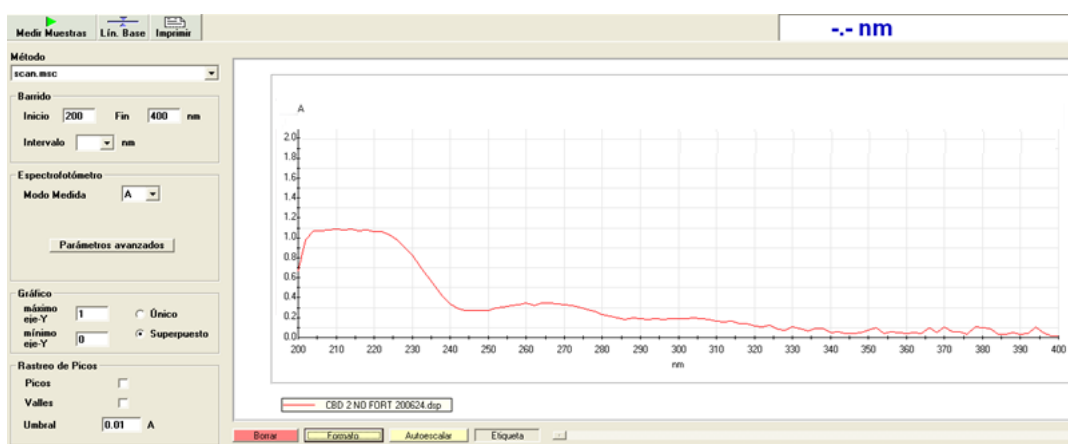


Fig. A1 Espectro de Absorción molecular UV de una muestra no fortificada

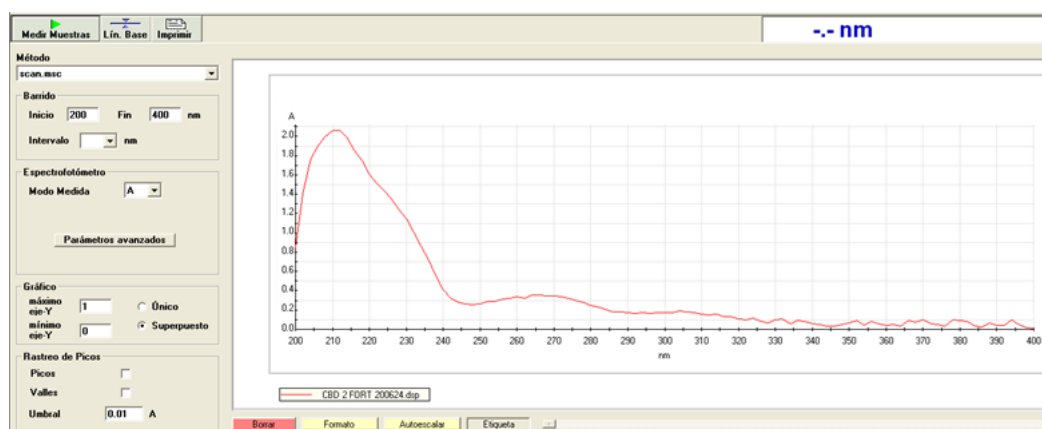


Fig. A2 Espectro de Absorción molecular UV de una muestra fortificada

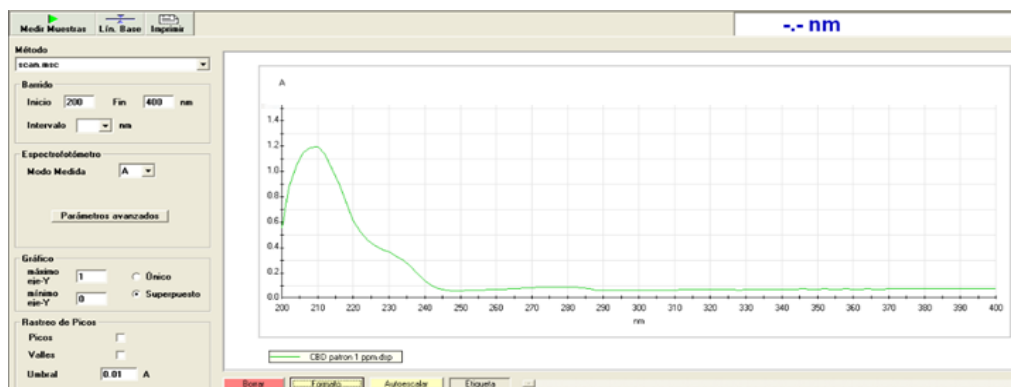


Fig. A3 Espectro de Absorción molecular UV del estándar de 1 ppm

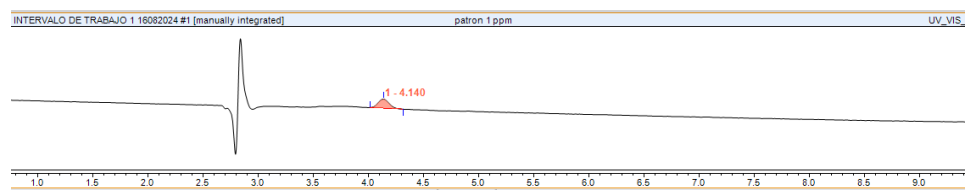


Fig. A4 Cromatograma del patrón de 1 ppm réplica 1

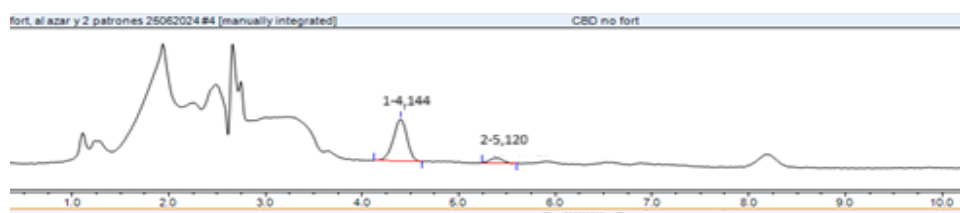


Fig. A5 Cromatograma de la muestra sin fortificar réplica 1

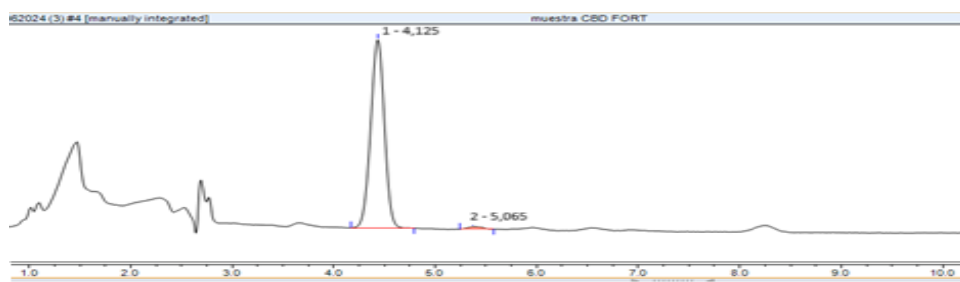


Fig. A6 Cromatograma de la muestra fortificada réplica 1

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	21-V01	
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Apéndice B: LOD Y LOQ

Resumen replica 1								
Estadísticas de la regresión								
Coefficiente de correlación múltiple	0,999686738							
Coefficiente de determinación R^2	0,999373573							
R^2 ajustado	0,999216967							
Error típico (So)	0,000296325							
Observaciones	6							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	romedio de los cuadrado	F	Valor critico de F			
Regresión	1	0,000560344	0,000560344	6381,424028	1,47185E-07			
Residuos	4	3,51234E-07	8,78086E-08					
Total	5	0,000560695						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-0,002003556	0,000292268	-6,855207297	0,0023705	-0,002815022	-0,00119209	-0,002815022	-0,001192091
Variable X 1	0,037506276	0,00046951	79,88381581	1,47185E-07	0,036202707	0,03880985	0,036202707	0,038809846
Análisis de los residuales								
	Observación	Pronóstico para Y	Residuos					
	1	0,007373013	2,69874E-05					
	2	0,009248326	5,16736E-05					
	3	0,016749582	0,000150418					
	4	0,020500209	-0,000500209					
	5	0,026126151	0,000273849					
	6	0,03550272	-2,71967E-06					
	LOD 1 (mg/L)		0,026072247					
	LOQ 1 (mg/L)		0,079006809					

Fig. B1 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 1

Resumen Réplica 2								
Estadísticas de la regresión								
Coefficiente de correlación múltiple	0,998688951							
Coefficiente de determinación R^2	0,99737962							
R^2 ajustado	0,996724525							
Error típico (So)	0,000566397							
Observaciones	6							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	romedio de los cuadrado	F	Valor crítico de F			
Regresión	1	0,000488425	0,000488425	1522,496354	2,57715E-06			
Residuos	4	1,28322E-06	3,20805E-07					
Total	5	0,000489708						
	Coefficientes	Error típico	Estadística t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-0,000526151	0,000558642	-0,941839072	0,399602322	-0,002077189	0,00102489	-0,002077189	0,001024888
Variable X 1	0,035016736	0,000897424	39,0191793	2,57715E-06	0,032525089	0,03750838	0,032525089	0,037508384
Análisis de los residuales								
	Observación	Pronóstico para Y	Residuos					
	1	0,008228033	0,000471967					
	2	0,00997887	2,11297E-05					
	3	0,016982218	-0,000382218					
	4	0,020483891	1,61088E-05					
	5	0,025736402	-0,000736402					
	6	0,034490586	0,000609414					
	LOD 2 (mg/L)	0,053377611						
	LOQ 2 (mg/L)	0,161750337						

Fig. B2 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 2



Facultad de
Ciencias Naturales y Matemáticas

FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN

CÓDIGO: FT-

21-V01

VERSIÓN: 01

FECHA: 05/10/2021

APROBADO POR:

Facultad de
Ciencias Naturales y
Matemáticas

Resumen Réplica 3								
Estadísticas de la regresión								
Coefficiente de correlación múltiple	0,996892772							
Coefficiente de determinación R^2	0,9937952							
R^2 ajustado	0,992244							
Error típico	0,001052485							
Observaciones	6							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	romedio de los cuadrado	F	Valor critico de F			
Regresión	1	0,000709677	0,000709677	640,6621686	1,44673E-05			
Residuos	4	4,4309E-06	1,10772E-06					
Total	5	0,000714108						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-0,002901883	0,001038074	-2,795447812	0,049038653	-0,005784039	-1,9726E-05	-0,005784039	-1,97262E-05
Variable X 1	0,042209205	0,001667603	25,31130515	1,44673E-05	0,037579197	0,04683921	0,037579197	0,046839213
Análisis de los residuales								
	Observación	Pronóstico para Y	Residuos					
	1	0,007650418	0,000949582					
	2	0,009760879	-6,08787E-05					
	3	0,01820272	9,72803E-05					
	4	0,02242364	-0,00132364					
	5	0,028755021	-0,000755021					
	6	0,039307322	0,001092678					
	LOD 3 (mg/L)		0,082285389					
	LOQ 3 (mg/L)		0,249349663					

Fig. B3 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 3

Resumen réplica 4								
Estadísticas de la regresión								
Coefficiente de correlación múltiple	0,997801363							
Coefficiente de determinación R^2	0,995607559							
R^2 ajustado	0,994509449							
Error típico	0,00087087							
Observaciones	6							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	romedio de los cuadrado	F	Valor crítico de F			
Regresión	1	0,000687621	0,000687621	906,655449	7,24569E-06			
Residuos	4	3,03366E-06	7,58415E-07					
Total	5	0,000690655						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-0,000193933	0,000858946	-0,225780159	0,832439503	-0,002578751	0,00219088	-0,002578751	0,002190884
Variable X 1	0,041548117	0,001379845	30,11071983	7,24569E-06	0,037717054	0,04537918	0,037717054	0,04537918
Análisis de los residuales								
	Observación	Pronóstico para Y	Residuos					
	1	0,010193096	-9,30962E-05					
	2	0,012270502	0,000729498					
	3	0,020580126	-0,001380126					
	4	0,024734937	0,000165063					
	5	0,030967155	0,000732845					
	6	0,041354184	-0,000154184					
	LOD 4 (mg/L)		0,069169737					
	LOQ 4 (mg/L)		0,209605265					

Fig. B4 Resumen estadística LOD Y LOQ réplica 4

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	LOD (mg/g)	LOQ (mg/g)
1	0,026072247	0,079006809	0,130	0,395
2	0,053377611	0,161750337	0,267	0,809
3	0,082285389	0,249349663	0,411	1,247
4	0,069169737	0,209605265	0,346	1,048
PROMEDIO	0,057726246	0,174928019	0,289	0,875
	Masa muestra (g)	0,2		
	FD	50		
	V metoh (mL)	20		
LOD (mg/g)	0,288631231			
LOQ (mg/g)	0,874640093			

Fig. B5 Datos levantados LOD Y LOQ

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Apéndice C: Linealidad

Resumen Día 1								
<i>Estadísticas de la regresión</i>								
Coefficiente de correlación	0,999711241							
Coefficiente de determinación	0,999422566							
R ² ajustado	0,999386476							
Error típico	0,010734							
Observaciones	18							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Medio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>			
Regresión	1	3,190728923	3,190728923	27692,79088	2,42789E-27			
Residuos	16	0,0018435	0,000115219					
Total	17	3,192572423						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	0,005709021	0,00387238	1,474292795	0,159806397	-0,002500057	0,0139181	-0,002500057	0,0139181
Pendiente	0,040466394	0,000243174	166,4115107	2,42789E-27	0,039951487	0,0409825	0,039951487	0,0409825
Análisis de los residuales								
<i>Observación</i>	<i>Predicción</i>	<i>Residuos</i>						
1	0,005709021	-0,004709021						
2	0,005709021	-0,005109021						
3	0,046176015	-0,005576015						
4	0,046176015	-0,005076015						
5	0,106876505	0,006923495						
6	0,106876505	0,008823495						
7	0,20804399	0,01475601						
8	0,20804399	0,01505601						
9	0,410378958	-0,000578958						
10	0,410378958	0,003821042						
11	0,612713926	-0,010813926						
12	0,612713926	-0,009913926						
13	0,815048894	-0,015548894						
14	0,815048894	-0,011648894						
15	1,017383862	-0,002983862						
16	1,017383862	-0,008383862						
17	1,21971883	0,01648117						
18	1,21971883	0,01448117						

Fig. C1 Resumen estadística de regresión día 1

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	



Fig. C2 Gráfico de residuales día 1

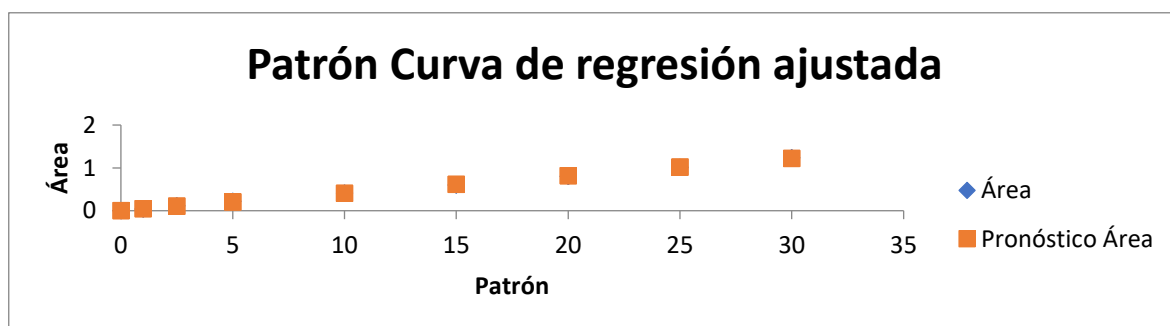


Fig. C3 Gráfico de regresión lineal día 1

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Resumen DÍA 2									
Estadísticas de la regresión									
Coefficiente de correlación	0,998921								
Coefficiente de determinación	0,9978431								
R^2 ajustado	0,9977083								
Error típico	0,0211937								
Observaciones	18								
ANÁLISIS DE VARIANZA									
Grados de libertad de cuadrados de los cu				F	Valor crítico de F				
Regresión	1	3,324871797	3,3248718	7402,189333	9,20644E -23				
Residuos	16	0,007186786	0,0004492						
Total	17	3,332058583							
	Coefficientes	Error típico	Estadístico	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%	
Intercepción	0,0248374	0,007645813	3,2484928	0,005036961	0,00862897	0,0410458	0,008629	0,041045771	
Pendiente	0,0413089	0,000480135	86,035977	9,20644E -23	0,040291041	0,0423267	0,040291	0,042326722	
Análisis de los residuales									
Observación	Estadístico An	Residuos							
1	0,0248374	-0,02153737							
2	0,0248374	-0,02003737							
3	0,0661463	0,004253748							
4	0,0661463	5,3748E -05							
5	0,1281096	-0,017109575							
6	0,1281096	-0,012109575							
7	0,2313818	0,000918221							
8	0,2313818	-0,000481779							
9	0,4379262	0,049573812							
10	0,4379262	0,051273812							
11	0,6444706	-0,009470596							
12	0,6444706	-0,000970596							
13	0,851015	8,49952E -05							
14	0,851015	-0,000115005							
15	1,0575594	0,006440587							
16	1,0575594	0,004540587							
17	1,2641038	-0,018003822							
18	1,2641038	-0,017303822							

Fig. C4 Resumen estadística de regresión día 2

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO: FT-21-V01	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

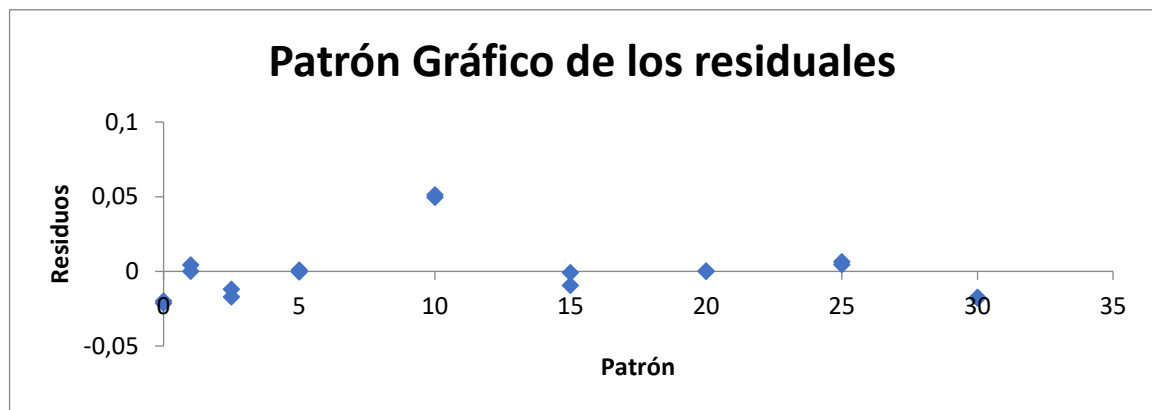


Fig. C5 Gráfico de residuales día 2

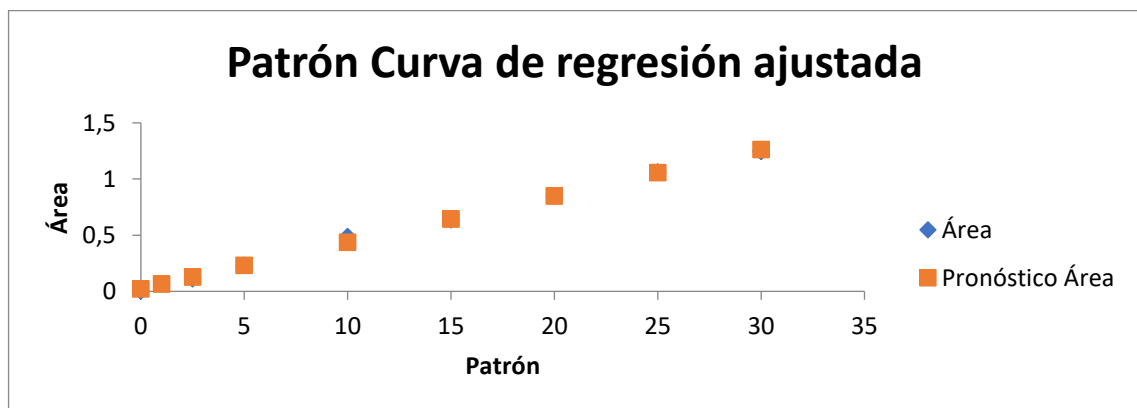


Fig. C6 Gráfico de regresión lineal día 2

Resumen DÍA 3									
<i>Estadísticas de la regresión</i>									
Coefficiente de correl	0,999584204								
Coefficiente de deterr	0,999168581								
R ² ajustado	0,999116618								
Error típico	0,014083199								
Observaciones	18								
ANÁLISIS DE VARIANZA									
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	cu	F	Valor crítico de F				
Regresión	1	3,8136569	3,8136569	19228,217	4,486E-26				
Residuos	16	0,0031734	0,0001983						
Total	17	3,8168303							
	Coefficientes	Error típico	Estadístico	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%	
Intercepción	-0,001502118	0,0050806	-0,295656	0,7712954	-0,012273	0,0092683	-0,012273	0,0092683	
Pendiente	0,04424119	0,000319	138,66585	4,486E-26	0,0435648	0,0449175	0,0435648	0,0449175	
Análisis de los residuales									
Observación	Pronóstico	Área	Residuos						
1	-0,001502118	0,0022021							
2	-0,001502118	0,0021021							
3	0,042739071	-0,005239							
4	0,042739071	-3,91E-05							
5	0,109100855	0,0094991							
6	0,109100855	0,0093991							
7	0,219703829	0,0123962							
8	0,219703829	0,0130962							
9	0,440909777	-0,00741							
10	0,440909777	-0,00261							
11	0,662115725	-0,030916							
12	0,662115725	-0,032416							
13	0,883321673	-0,007022							
14	0,883321673	-0,002622							
15	1,10452762	0,0111724							
16	1,10452762	0,0115724							
17	1,325733568	0,0010664							
18	1,325733568	0,0157664							

Fig. C7 Resumen estadística de regresión día 3



Fig. C8 Gráfico de residuales día 3

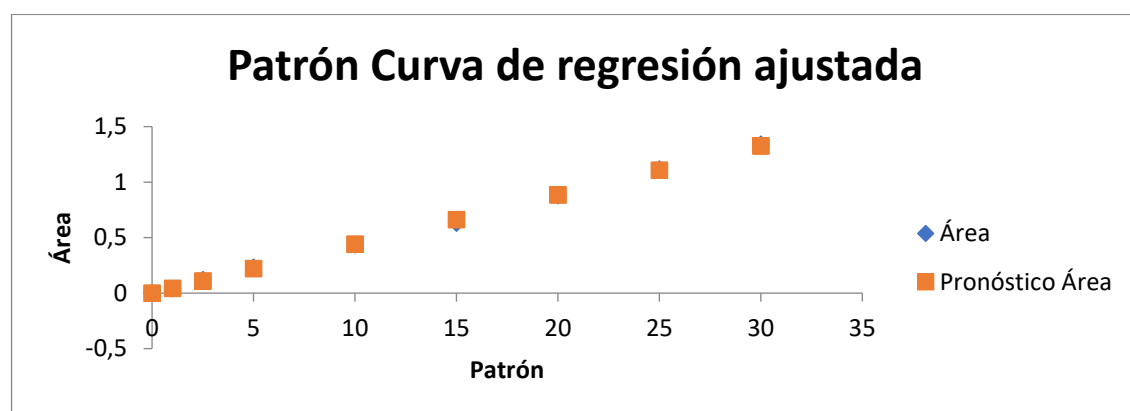


Fig. C9 Gráfico de regresión lineal día 3

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN	
	CÓDIGO:	FT- APROBADO POR:
	21-V01	Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	VERSIÓN: 01	
	FECHA: 05/10/2021	

Apéndice D: Repetibilidad Intermedia

NIVEL BAJO													
	Día 1 (aNALISTA 1)	Día 2 (Analista 1)	Día 3 (Analista 2)		VARIANZA 1	VARIANZA 2	VARIANZA 3		VAR. MAX	SUMA VARIANZA	Q calculado	Q teórico	Resultado
Nivel bajo 12.5 (mg/g)	13.34765728	13.8	13.57530571		0.178898246	0.166259141	0.282546073		0.2825	0.627737461	0,450102	0,589500	Si Q cal < Q teo (se acepta la Ho)
	12.81307849	13.2	13.70555435					Si Q cal > Q teo (se rechaza la Ho)					
	13.41833333	13.3	13.56951465					No existe diferencia significativa entre las varianzas (Las varianzas son homogéneas)					
	13.78488323	12.9	13.78966999										
	12.80057502	13.9	12.62876246										
	Número de grupos	k	3										
	Tamaño de grupo	p	5										
	Grados de libertad	v	p-1										
	Promedio	DCMW (varianza repetibilidad)	Sr	RSDr (%CV)	DCMB (varianza reproducibilidad)	VL	Condicional (Si VL es negativo, el valor se considera cero)	Vi varianza intermedia	SI	%RSDi (%CV)			
	13.39	0,20924582	0,4574	3,42	0,11742528	0,0000		0,2092	0,457	3,42			
DCMW	Diferencia promedio de cuadrados dentro de grupos			Varianza por repetibilidad		VL = $\frac{(DCMB - DCMW)}{p}$							
DCMB	Diferencia promedio de cuadrados entre grupos			Varianza por reproducibilidad									
Sr	Desviación estándar por repetibilidad					Vi = DCMw + VL							
RSDr	Desviación estándar relativa por repetibilidad												
%CV r	Coeficiente de variación por repetibilidad (lo mismo a RSD)												
VL	Varianza intralaboratorio												
Vi	Varianza intermedia												
Si	Desviación estándar precisión intermedia												

Fig. D1 Determinación de repetibilidad intermedia nivel bajo.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Día 1 (aNALISTA 1)	5	66,16474181	13,23294836	0,178898246		
Día 2 (Analista 1)	5	67,00954428	13,40190886	0,166293141		
Día 3 (Analista 2)	5	67,69444192	13,53888838	0,282546073		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,234850559	2	0,11742528	0,561183394	0,584809528	3,885293835
Dentro de los grupos	2,510949842	12	0,20924582			
Total	2,745800401	14				

Fig. D2 Análisis de la varianza nivel bajo.

 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas				FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN			
				CÓDIGO:	FT-	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas	
				21-V01			
				VERSIÓN: 01			
				FECHA: 05/10/2021			

NIVEL ALTO													
	Día 1 (ANALISTA 1)	Día 2 (Analista 1)	Día 3 (Analista 2)		VARIANZA 1	VARIANZA 2	VARIANZA 3		VAR. MAX	SUMA VARIANZA	Q calculado	Q teórico	Resultado Si Q cal < Q tes (se acepta la Ho) Si Q cal > Q tes (se rechaza la Ho)
Nivel alto 125 (mg/g)	117.9889653	116.5418416	118.813953		1,291425503	2,803028091	43,19892382		43,1989	47,29337741	0,913424	0,589500	No existe diferencia significativa entre la varianzas (Las varianzas son homogéneas)
	117.099111	114.9876832	115.3999069										
	116.5498393	116.8322351	108.099906										
	116.4807606	114.8443805	117.7633603										
	118.3802849	117.9078212	103.2479969										
	Número de grupos	k	3										
	Tamaño de grupo	p	5										
	Grados de libertad	v	p-1										
	Promedio	DCMW (varianza repetibilidad)	Sr	RSDr (%CV)	DCMB (varianza reproducibilidad)	VL	Condicional (Si VL es negativo, el valor se considera cero)	Vi varianza intermedia	Si	%RSDi (%CV)			
	115,52	15,76445914	3,9704	3,44	26,9903613	2,2452		18,0096	4,244	3,67			
	DCMW	Diferencia promedio de cuadrados dentro de grupos		Varianza por repetibilidad		$VL = \frac{(DCMB - DCMW)}{p}$							
	DCMB	Diferencia promedio de cuadrados entre grupos		Varianza por reproducibilidad									
	Sr	Desviación estándar por repetibilidad				$Vi = DCMW + VL$							
	RSDr	Desviación estandar relativa por repetibilidad											
	%CV r	Coeficiente de variación por repetibilidad (lo mismo a RSD)											
	VL	Varianza intralaboratorio											
	Vi	Varianza intermedia											
	Si	Desviación estándar precisión intermedia											

Fig. D3 Determinación de repetibilidad intermedia nivel alto.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Día 1 (aNALISTA 1)	5	585,4791512	117,0958302	1,291425503		
Día 2 (Analista 1)	5	583,1145615	116,6229123	2,803028091		
Día 3 (Analista 2)	5	564,2803143	112,8560629	43,19892382		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	53,98072261	2	26,9903613	1,712101955	0,221753727	3,885293835
Dentro de los grupos	189,1735096	12	15,76445914			
Total	243,1542322	14				

Fig. D4 Análisis de la varianza nivel alto.

	FORMATO DE PROYECTO DE TITULACIÓN		
	CÓDIGO:	FT-	APROBADO POR: Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
	21-V01		
	VERSIÓN: 01		
	FECHA: 05/10/2021		

Apéndice E: Robustez

	ENSAYO	Tiempo de retención (min)	ÁREA	Altura	CONCENTRACIÓN DEL EQUIPO (CURVA DE CALIBRACION) (PPM)	Concentración final (mg/g)					
	1	3,253	0,8645	9,97	19,57456676	62,61857569	patron 10 ppm = tr 3.253, area= 0.4144 altura =4.54				
	2	4,51	2,3589	13,73	53,31909074	170,5665091	patron 10 ppm = tr 4.543, area= 0.43434 altura =3.17				
	3	3,327	0,774	8,85	17,49500879	55,96611896	patron 10 ppm = tr 3.323, area= 0.3371 altura =3.78				
	4	4,707	0,8874	5,71	20,05823101	64,16580616	patron 10 ppm = tr 4.680, area= 0.3157 altura =2.44				
	5	5,703	1,2075	7,05	27,29356991	87,31148404	patron 10 ppm = tr 5.687, area= 0.5190 altura =2.96				
	6	4,053	1,4993	11,53	33,88923343	108,4108555	patron 10 ppm = tr 4.047, area= 0.5179 altura =4.56				
	7	5,527	3,5547	14,41	80,34820121	257,0319936	patron 10 ppm = tr 5.543, area= 0.4173 altura =2.82				
	8	3,98	1,2077	9,66	27,29809058	87,32594557	patron 10 ppm = 3.977, area= 0.3711 altura =3.57				
ítem asignación	VARIABLE	Bajo	ALTO	ANÁLISIS							
				1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	Flujo, ml/min	0,45	0,55	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	Volumen de inyección, ul	9	11	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	Longitud de onda, nm	270	280	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	Temperatura de la columna, °C	20	25	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	Fase Móvil	58:28:14	62:32:06	E	e	E	e	e	E	e	E
		MeTOH:ACN:H2O		s	t	u	v	w	x	y	z
	RESULTADOS (mg/g)			62,619	170,567	55,966	64,166	87,311	108,411	257,032	87,326

Fig. E1 Datos evaluación de robustez.

