

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 CROMATOGRÁFICO PARA LA
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES EN
EXTRACTOS VEGETALES**

AUTOR:

CAMILO ANDRÉS RAMÍREZ JARAMILLO

Guayaquil - Ecuador

2025

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo la validación de un método analítico para la determinación cuantitativa de polifenoles y flavonoides en extractos vegetales, utilizando cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD). Este estudio se enmarca en la necesidad que presenta el Ecuador debido a su gran biodiversidad de caracterizar biocompuestos naturales según su potencial bioactivo. El método analítico fue desarrollado y validado para la separación y cuantificación simultánea de nueve analitos de interés: ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, rutina, quercetina, naringenina y kaempferol. La validación del método incluyó la evaluación de especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) según los requisitos basados en la guía de validación ICH. Los resultados obtenidos demostraron que el método es lineal dentro del rango de trabajo 0,5 mg/l-3,0 mg/l, es selectivo y reproducible, con coeficientes de correlación superiores a 0.99 en las curvas de calibración y una resolución cromatográfica adecuada para la separación de los compuestos analizados. Se observó una recuperación entre 90-110%, confirmando su precisión y aplicabilidad en la cuantificación de polifenoles en matrices vegetales. Este estudio contribuye al desarrollo de técnicas confiables para la evaluación de biocompuestos en matrices naturales.

Palabras clave: Validación, polifenoles, flavonoides, UPLC.

ABSTRACT

This study aims to validate an analytical method for the quantitative determination of polyphenols and flavonoids in plant extracts using Ultra High Performance Liquid chromatography (UPLC) with a diode array detector (DAD). This research is due Ecuador's need to characterize natural bioactive compounds due to its vast biodiversity. The analytical method was developed and validated for the simultaneous separation and quantification of nine target analytes: gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, rutin, quercetin, naringenin, and kaempferol. The method validation included the assessment of specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) according to the requirements of the ICH standard.

The results demonstrated that the method is linear within the working range of 0.5 mg/L–3.0 mg/L, selective, and reproducible, with correlation coefficients above 0.99 in calibration curves and adequate chromatographic resolution for the separation of the analyzed compounds. A recovery rate between 90% and 110% was observed, confirming its precision and applicability in the quantification of polyphenols in plant matrices. This study contributes to the development of reliable techniques for evaluating bioactive compounds in natural matrices.

Keywords: Validation, polyphenols, flavonoids, UPLC.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con todo mi amor a mi mamá, Fanny Zulema Jaramillo Carreño, quien siempre ha sido mi mayor fuente de apoyo y motivación. Gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y por inspirarme a seguir aprendiendo cada día, con la certeza de que el estudio es la clave para seguir creciendo.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por iluminar mi camino y darme la fortaleza para seguir adelante. A mi esposa e hijos, por su comprensión, tiempo y paciencia incondicional durante todo este proceso de estudio. Agradezco profundamente a ESPOL y la FCNM por los recursos e incentivos brindados, los cuales han sido clave en mi desarrollo profesional. Mi más sincero agradecimiento a mi tutor, PhD. Joel Vielma, por su constante guía y valiosas correcciones. Al profesor PhD. Joan Vera, por su paciencia, orientación y sabiduría, y al profesor MsC. Kevin Cedeño, por su apoyo, confianza y respaldo en la ejecución de este proyecto. Sin todos ustedes, este logro no hubiera sido posible.

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.

Camilo Ramírez Jaramillo, Ing.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Joan Vera Villalobos, PhD.

PRESIDENTE

Joel Vielma Puente, PhD.

TUTOR

César Araque Molina, PhD.

DOCENTE EVALUADOR

ABREVIATURAS O SIGLAS

DAD o PDA	Detector de arreglos de diodos
RMN	Resonancia magnética nuclear
QE	Equivalente químico
Mg:	Miligramo
HPTLC:	Cromatografía de capa delgada de alto rendimiento
MS	Espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
ATPS	Sistemas acuosos de dos fases
ATLD	Algoritmo de descomposición trilineal alternante
Mg	Microgramo
UV-Vis	Ultravioleta- visible
ICH	Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (por sus siglas en inglés)
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés)
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
Mg/l	Miligramos sobre litros
Ppm	Partes por millón
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia
Std. Desv.	Desviación estándar
%RSD	Porcentaje de desviación estándar relativa

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Descripción del problema	2
Planteamiento.....	4
1.3 Objetivos.....	4
Objetivo General:.....	4
Objetivos Específicos:	4
1.4 Hipótesis	4
1.5 Alcance	4
CAPÍTULO 2	6
2 MARCO TEÓRICO	6
2.1 Biocompuestos, metabolitos secundarios, polifenoles y flavonoides	6
2.2 Propiedades Biológicas y Funcionales de los Polifenoles y Flavonoides	8
2.3 Métodos de Separación y Análisis de Polifenoles y Flavonoides	12
2.3.1 Métodos Tradicionales.....	12
2.3.2 Métodos Modernos	12
2.4 Ventajas y Limitaciones de la Espectroscopía UV-Vis.....	13
2.5 Ventajas y Limitaciones de las Reacciones Fitoquímicas.....	14
2.6 Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC).....	15
2.7 Cromatografía en Fase Reversa.....	16
2.8 Cromatograma.....	17
2.9 Equipo HPLC	17
2.10 Aplicaciones de Métodos Cromatográficos en Fitoquímica.	19
2.11 Uso de HPLC en el Análisis de Extractos Vegetales	19
2.12 Validación de Métodos Analíticos	19
2.13 Clasificación de la Validación	21
2.14 Parámetros de Validación	22
2.14.1 Linealidad	24
2.14.2 Límite de Detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ)	24
2.14.3 Selectividad	24
2.14.4 Precisión	25
2.14.5 Repetibilidad	25

2.14.6	Reproducibilidad	26
2.15	Importancia de la Validación de Métodos para Asegurar la Calidad y Precisión de los Resultados en Investigaciones Fitoquímicas.....	26
2.16	Importancia de la Biodiversidad de Ecuador en la Investigación de Biocompuestos	26
2.17	Relevancia del Estudio de Extractos Vegetales en el Contexto Local y Global	27
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
3.2.3	Recolección de datos	30
3.2.4	Análisis estadístico	37
CAPÍTULO 4		39
4	RESULTADOS.....	39
4.1	Desarrollo del método.....	39
4.1.1	Parámetros cromatográficos para el desarrollo de la metodología..	39
4.1.2	Desarrollo de la metodología	39
4.2	Pretratamiento de la matriz.....	46
4.3	Validación del método.....	46
4.3.1	Especificidad.....	46
4.3.2	Linealidad.	48
4.3.3	Efecto matriz.....	57
4.3.4	Límite de detección.....	59
4.3.5	Límite de cuantificación	60
4.3.6	Exactitud	61
4.3.7	Precisión	63
4.4	Evaluación de la Idoneidad del Método Cromatográfico para la Cuantificación de Polifenoles y Flavonoides en Extractos Vegetales.....	67
CAPÍTULO 5		70
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
5.1	Conclusiones	70
5.2	Recomendaciones	71

6	REFERENCIAS	72
7	APÉNDICES Y ANEXOS	77

LISTADO DE FIGURAS

Fig. 2.1 Estructura química (a)Polifenol: ácido gálico (b) Flavonoide: catequina. [17].....	8
Fig. 2.2 Esquema de un cromatógrafo de líquidos. [33].....	18
Fig. 4.1 Cromatograma ácido p-coumárico en condiciones de primer método probado.....	41
Fig. 4.2 Cromatograma de mezcla en condiciones de primer método probado.	41
Fig. 4.3 Cromatograma de mezcla en condiciones del segundo método probado.	42
Fig. 4.4 Cromatograma Naringenina en condiciones de método óptimo.....	43
Fig. 4.5 Cromatograma p-coumárico en condiciones de método óptimo.	43
Fig. 4.6 Cromatograma de mezcla en condiciones del método óptimo. Primera corrida.	44
Fig. 4.7 Cromatograma de método óptimo de la mezcla de nueve analitos identificados preparado en metanol a 3 ppm.	44
Fig. 4.8 Cromatograma general (verde) contrastado con cromatograma del ac. Cafeico (morado).	45
Fig. 4.9 Cromatograma general (verde) contrastado con cromatograma del ac. Siríngico.....	45
Fig. 4.10 Cromatograma de mezcla en matriz fortificado a 3ppm. Se señala picos más cercanos considerados para la resolución.	47
Fig. 4.11 Curvas de regresión lineal para ácido gálico.....	48
Fig. 4.12 Curvas de regresión lineal para ácido clorogénico.....	49
Fig. 4.13 Curvas de regresión lineal para ácido cafeico.....	49
Fig. 4.14 Curvas de regresión lineal para ácido p-coumárico.	50
Fig. 4.15 Curvas de regresión lineal para ácido Siríngico.....	50
Fig. 4.16 Curvas de regresión lineal para Rutina.	51
Fig. 4.17 Curvas de regresión lineal para quercetina.	51
Fig. 4.18 Curvas de regresión lineal para Naringenina.	52
Fig. 4.19 Curvas de regresión lineal para kaempferol.	52
Fig. 4.20 Análisis de residuales de ácido gálico.	55
Fig. 4.21 Análisis de residuales de ácido clorogénico.	55
Fig. 4.22 Análisis de residuales de ácido cafeico.	55
Fig. 4.23 Análisis de residuales de ácido p-coumárico.....	55
Fig. 4.24 Análisis de residuales de ácido siríngico.....	56
Fig. 4.25 Análisis de residuales de rutina.	56
Fig. 4.26 Análisis de residuales de quercetina.....	56
Fig. 4.27 Análisis de residuales de Naringenina.....	56
Fig. 4.28 Análisis de residuales de kaempferol.....	57

LISTADO DE TABLAS

TABLA 2.1 PLANTAS MEDICINALES CON CONTENIDO FENÓLICOS EN ECUADOR	10
TABLA 2.2 PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN A SOLO PARA ANÁLISIS A NIVEL DE TRAZAS (PPN,PPB,PPT).....	23
TABLA 3.1 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	32
TABLA 3.2 TIEMPOS DE RETENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS... ¡Error! Marcador no definido.	
TABLA 4.1 GRADIENTE PRIMER MÉTODO PROBADO	40
TABLA 4.2 GRADIENTE SEGUNDO MÉTODO PROBADO	42
TABLA 4.3 GRADIENTE MÉTODO ÓPTIMO	45
TABLA 4.4 RESULTADOS RESOLUCIÓN ENTRE PICOS MÁS CERCANOS....	47
TABLA 4.5 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO GÁLICO	52
TABLA 4.6 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO CLOROGÉNICO	53
TABLA 4.7 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO CAFEICO	53
TABLA 4.8 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO P-COUMÁRICO	53
TABLA 4.9 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO SÍRINICO	53
TABLA 4.10 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO RUTINA	53
TABLA 4.11 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO QUERCETINA	54
TABLA 4.12 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO NARINGENINA	54
TABLA 4.13 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO P-COUMÁRICO	54
TABLA 4.14 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO GÁLICO	57
TABLA 4.15 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO CLOROGÉNICO	58
TABLA 4.16 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO CAFEICO	58
TABLA 4.17 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA P-COUMÁRICO	58
TABLA 4.18 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO SIRÍNGICO	58
TABLA 4.19 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA RUTINA.....	58
TABLA 4.20 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA QUERCETINA.....	59
TABLA 4.21 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA NARINGENINA	59
TABLA 4.22 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA KAEMPFEROL.....	59
TABLA 4.23 RESULTADOS DE LÍMITE DE DETECCIÓN PARA CADA ANALITO	60

TABLA 4.24 RESULTADOS DE LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA CADA ANALITO	60
TABLA 4.25 RESULTADOS DE EXACTITUD PARA ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO CLOROGÉNICO, ÁCIDO CAFEICO	61
TABLA 4.26 RESULTADOS DE EXACTITUD PARA ÁCIDO SIRÍNICO, ÁCIDO P-COUMÁRICO, RUTINA	61
TABLA 4.27 RESULTADOS DE EXACTITUD PARA QUERCETINA, NARINGENINA, KAEMFEROL	62
TABLA 4.28 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO GÁLICO	63
TABLA 4.29 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO CLOROGÉNICO	64
TABLA 4.30 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO CAFEICO	64
TABLA 4.31 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO SIRÍNGICO	64
TABLA 4.32 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO P-COUMÁRICO	65
TABLA 4.33 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA RUTINA.....	65
TABLA 4.34 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA QUERCETINA.....	65
TABLA 4.35 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA NARINGENINA	66
TABLA 4.36 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA KAEMPFEROL.....	66

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La cromatografía es una técnica de análisis de separación de mezclas complejas con base a la afinidad del analito con la fase móvil y la fase estacionaria utilizada. La fase estacionaria es la encargada de retener a la muestra mientras la fase móvil fluye tratando de arrastrar los activos a través del lecho estacionario. Los compuestos más afines a la fase estacionaria serán los más retenidos mientras que los afines a la fase móvil eluirán con rapidez y se mostrarán en forma de picos gaussianos en los cromatogramas, siempre y cuando se utilice un detector adecuado[1].

Originalmente, la cromatografía por capa fina y en papel eran las técnicas cualitativas utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos. Estas técnicas usan eluyentes para que las moléculas recorran el papel o la sílica gel y se separen con base en su polaridad o peso, sin embargo, estas técnicas han sido ahora relevadas y utilizadas únicamente como un análisis preliminar para la caracterización del analito[2].

Actualmente se prefiere para este método utilizar la fase estacionaria de forma inversa con columnas del tipo C18 y para la fase móvil se recomienda que esta sea en gradiente para una correcta separación de los picos, además de contar mínimo con la ayuda de un detector de arreglos de diodos (DAD o PDA) que logre tener la sensibilidad de detección adecuada para los polifenoles[2].

Bationo *et al.* [3] en 2022 realizaron estudios en plantas medicinales de Burkina Faso, cuyas hojas se usan en muchas recetas tradicionales para tratar diferentes enfermedades. Este estudio permitió cuantificar, aislar y caracterizar los principales flavonoides presentes en el extracto metanólico de las hojas de la planta *Cymbopogon giganteus*. El análisis de contenido de flavonoides mostró valores que van desde 134 a 270 µg QE/mg extracto. A través de HPTLC-MS se identificaron

seis picos correspondientes a compuestos fenólicos. Por otra parte, a través de cromatografía en columna y métodos físicos, lograron aislar y caracterizar tres flavonoides: epicatequina, luteolina 8-C-glucósidos y luteolina 6-C-glucósido cuyas estructuras se caracterizaron por RMN. Este estudio ha proporcionado resultados relevantes para contribuir al conocimiento de las moléculas bioactivas de la flora local de Burkina Faso para su consideración como alternativa a productos sintéticos en varios campos.

Zhang *et al.* [4] en 2023 realizaron un estudio que estableció un método preciso, rápido y ecológico para la extracción y análisis cuantitativo de flavonoides en miel utilizando la extracción acuosa de dos fases combinada con el HPLC-DAD. En comparación con el método tradicional de extracción en fase sólida, el método basado en un sistema de extracción de dos fases alcohol/agua mostró recuperaciones satisfactorias, menor límite de detección y mayor sensibilidad, verificando aún más su precisión y estabilidad.

1.2 Descripción del problema

A medida que la investigación científica ha avanzado, se ha centrado el interés en los posibles beneficios de los biocompuestos provenientes de la flora, ya que es innegable las incidencias que indican una relación directa entre los mecanismos químicos de los compuestos fenólicos y la salud del ser humano. Estos compuestos forman parte de una de las familias más importantes de fármacos flebotrópicos que ayudan a la mejora de la circulación sanguínea ayudando a prevenir enfermedades cardiovasculares[5]. Sumado a esto, se enlista un sinfín de propiedades beneficiosas para el hombre como lo son: antioxidantes, antitrombóticas, antiinflamatorias, vasodilatadores, vasoprotectores, entre otros [6].

Ecuador, con su rica biodiversidad y extensa flora, posee un inmenso potencial para la exploración de biocompuestos. La variabilidad climática y geográfica del país, desde las regiones costeras hasta las montañas de Los Andes y la selva amazónica, albergan una amplia gama de especies vegetales aún por descubrir. Estos ecosistemas únicos ofrecen un laboratorio natural para la investigación de

nuevas moléculas con potenciales aplicaciones en medicina, cosmética, agricultura y otros campos. La búsqueda de biocompuestos en Ecuador no solo promueve la conservación de su diversidad biológica, sino que también abre oportunidades para el desarrollo de la biotecnología y la innovación científica, contribuyendo así al crecimiento sostenible del país y al bienestar global [7].

Los metabolitos secundarios, particularmente los polifenoles y flavonoides, ofrecen una actividad antioxidante significativa que puede tener impactos positivos en la salud humana. Estas moléculas, ampliamente distribuidas en plantas, tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres y reducir el estrés oxidativo en el cuerpo, lo que está asociado con la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento prematuro [8]. Los polifenoles, incluidos los flavonoides, son conocidos por sus propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras, así como por su capacidad para mejorar la salud cardiovascular y modular la respuesta inmunitaria [9].

La determinación cuantitativa de metabolitos es crucial debido a la correlación directa entre su concentración y la potencial actividad biológica que se desea evaluar. Inicialmente, la cuantificación puede emplearse mediante métodos universales de baja especificidad, como las reacciones de identificación fitoquímica; sin embargo, estos métodos solo brindan datos sobre la presencia de los metabolitos, sin especificar cantidades precisas [10].

Una técnica frecuentemente utilizada es la espectroscopía UV-Vis, que permite realizar estimaciones cuantitativas. No obstante, esta estrategia presenta limitaciones, ya que los resultados suelen expresarse como equivalentes de un metabolito específico, como los polifenoles expresados en equivalentes de Ácido Gálico. Esta baja especificidad impide determinar la potencia biológica asociada a otros metabolitos presentes en la muestra [11].

Ante la necesidad de desarrollar nuevas propuestas terapéuticas en las diversas áreas de la farmacología, y en el contexto de las estrategias de biodescubrimiento, es fundamental establecer una relación cuantitativa precisa entre la estructura

química de los metabolitos, su concentración y su actividad biológica [12]. Las técnicas cromatográficas, en particular, han demostrado ser efectivas para resolver los perfiles de metabolitos en extractos de productos naturales durante la exploración fitoquímica. Combinadas con una rigurosa validación metodológica, estas técnicas garantizan la determinación inequívoca y cuantitativa de las sustancias de referencia[13]. Lo que nos lleva a plantear la siguiente incógnita; *¿Cómo puede establecerse un método cromatográfico validado para la cuantificación precisa de polifenoles y flavonoides en extractos vegetales con el fin de evaluar su concentración y potencial actividad antioxidante?*

Planteamiento

1.3 Objetivos

Objetivo General:

Evaluar un método cromatográfico para la determinación cuantitativa de polifenoles y flavonoides en extractos vegetales.

Objetivos Específicos:

- Desarrollar un diseño experimental para la validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución de polifenoles y flavonoides en extracto vegetal.
- Evaluar los parámetros de validación y desempeño del método analítico.
- Comprobar la idoneidad del método para extractos vegetales.

1.4 Hipótesis

El desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos permite la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en un extracto vegetal.

1.5 Alcance

El proyecto será realizado en las instalaciones del laboratorio de Síntesis y Caracterización Química de la ESPOL ubicado en la ciudad de Guayaquil.

En este proyecto se utilizará como método instrumental la cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos y el método permitirá identificar y cuantificar fenoles y flavonoides en extractos de matrices vegetales.

CAPÍTULO 2

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Biocompuestos, metabolitos secundarios, polifenoles y flavonoides

Un biocompuesto es aquel que se obtiene de una fuente natural como las plantas, animales o microorganismos. Pueden tener distintos tipos de estructuras y funciones. Actualmente, son de gran interés debido a las propiedades intrínsecas que estos pueden llegar a aportar en beneficio al ser humano. Los biocompuestos tienen un gran potencial para diversas aplicaciones y ofrecen alternativas sostenibles a los compuestos químicos o fármacos sintéticos que habitualmente acostumbramos a usar [14].

Los biocompuestos se organizan en dos grandes grupos: Biocompuestos Orgánicos e inorgánicos .

- a) Biocompuestos Orgánicos: o moléculas orgánicas, son aquellos sintetizados por los seres vivos. Se caracterizan por su alto contenido de carbono y sus enlaces de hidrógeno. Dentro de este gran grupo aun podemos hacer una subdivisión más ya que para algunos casos un proceso de síntesis química suele llegar a ser requerida de manera adicional para su producción, como tal, también podemos encontrar: Biocompuestos orgánicos naturales y Biocompuestos orgánicos artificiales. A modo de resumen, algunas de las aplicaciones más comunes para estos compuestos incluyen: alimentos y bebidas, medicina, cosméticos, agricultura y energías renovables [15].
- b) Biocompuestos Inorgánicos: Derivados de fuentes inorgánicas como minerales y metales, suelen tener una aplicación biológica o biomédica. A diferencia de sus semejantes orgánicos, los biocompuestos inorgánicos están compuestos por elementos inorgánicos como los metales, óxidos, sulfuros y otros. Suelen originarse por la combinación de diferentes fenómenos químicos y físicos como la fusión o la electrólisis. Dentro de sus aplicaciones más comunes se encuentran:

Biomateriales, diagnóstico y terapia, catálisis, energía y materiales de construcción y medioambiente [15].

Por otra parte, un metabolito secundario es un compuesto orgánico producido por un organismo vivo, como las plantas, hongos o microorganismos, y que se caracteriza porque no es esencial para su crecimiento, desarrollo o reproducción, pero que le otorga ventajas de adaptación, como defensa contra depredadores, protección frente a enfermedades o atracción de polinizadores. A diferencia de los metabolitos primarios (como aminoácidos, carbohidratos y lípidos), los metabolitos secundarios suelen ser específicos de ciertas especies y se producen en respuesta a estímulos ambientales. Estos metabolitos poseen un alto valor medicinal y económico [16].

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales

- a) Terpenos: Hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- b) Compuestos fenólicos: Cumarinas, Flavonoides, Lignina y taninos.
- c) Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- d) Alcaloides.

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los compuestos fenólicos los cuales son caracterizados por la presencia de grupos fenólicos en su estructura química como en la estructura del ácido gálico de la Fig. 2.1(a), en el caso de poseer múltiples grupos fenólicos son denominados polifenoles. Si la estructura básica del polifenol es de 15 carbonos organizada en tres anillos (C6-C3-C6) se subclasifican como flavonoides [16]. La estructura química de la catequina que se muestra en la Fig. 2.1(b) es ejemplo de la estructura de un flavonoide.

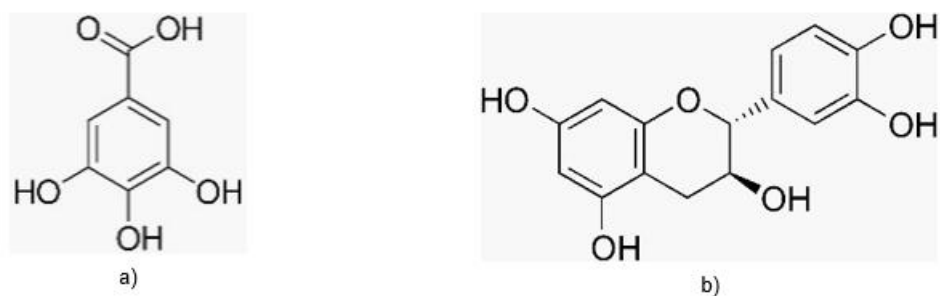


Fig. 2.1 Estructura química (a)Polifenol: ácido gálico (b) Flavonoide: catequina. [17]

2.2 Propiedades Biológicas y Funcionales de los Polifenoles y Flavonoides

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal que ha logrado demostrar en los últimos años que al consumir una dieta rica balanceada en ellos puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de ciertas enfermedades[18].

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas e interferir en varios procesos celulares, puede deberse a la fisicoquímica de estos, lo que les permite participar en distintas reacciones metabólicas, especialmente las de óxido-reducción, generando así un efecto antioxidante en el cuerpo humano [9].

Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante del reino vegetal. Y dentro de esta subclase, existen varios subgrupos como lo son: Flavonoles, Flavonas, Flavanonas, Isoflavonas, Antocianidinas y Flavanoles [16].

Cada una de ellas caracterizada por su propia estructura carbonada. No obstante, pese a sus beneficios y su extensa presentación en el reino vegetal, se debe introducir un concepto importante para poder comprender mejor la funcionabilidad de estos compuestos. La biodisponibilidad, este conceto, cobra una gran importancia una vez que se conoce que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo. Esto puede deberse a que son altamente metabolizados por el cuerpo, baja absorción en el intestino o por tener una menor

actividad intrínseca. En general, la mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucosidos o polímeros, formas que no suelen ser de fácil absorción para el cuerpo humano[16].

Dentro de los compuestos fenólicos que pueden llegar a tener una mejor absorción se encuentran los flavonoides. Los flavonoides son un grupo diverso de fitonutrientes que se encuentra en muchas frutas, verduras y especias. Dichos compuestos son los culpables de los colores tan característicos y brillantes de las frutas y verduras. A lo largo de los años, sus más de 6000 especies han demostrado contener poderosas actividades antioxidantes, ser antiinflamatorios, ayudan al sistema cardiovascular y potencian al sistema inmunológico, llegando a ser así un poderoso aliado frente a enfermedades cancerígenas y cardiovasculares [8]. Históricamente, estos nutrientes han sido usados por generaciones y culturas pasadas para: Protección cutánea, mejorar la función cerebral, regular la presión arterial y disminuir el contenido de azúcar en la sangre [19].

Algunos de los alimentos que contienen compuestos de la familia de los flavonoides son:

- a) Brócoli, cebollas, coles de bruselas y puerros: Se les atribuye al grupo de los flavonoles con propiedades antihistamínicas, antiinflamatorias y antioxidantes.
- b) Manzanas, uvas, cacao y té: Pertenecen al grupo de las flavanoles, relacionadas con la salud cardiovascular, el relajamiento, además de también poseer actividad antioxidante y antiinflamatoria.
- c) Cítricos: Son frutas ricas en flavanonas que retrasan el metabolismo de los fármacos.
- d) Apio, perejil, cilantro: Son buenas fuentes de flavonas que también retrasan el metabolismo de fármacos.
- e) Arándanos, ciruelas y uvas: Están bajo las antocianidinas que se asocian a la salud cardíaca y ayudan regular el metabolismo logrando controlar los efectos de la obesidad y la diabetes [20].

Dado los beneficios de los compuestos fenólicos en favor de la salud pública es necesario documentar sus propiedades y cuantificar sus beneficios sobre todo en un país tan rico y diverso en flora como lo es el Ecuador.

En los últimos 15 años se han reportado más de 2000 especies de especies vegetales nuevas, de las cuales 1600 son de interés para la industria y la ciencia[7]. Actualmente, se pueden documentar un total de 83 plantas que presentan contenido fenólico en el Ecuador repartidas por las diferentes regiones [21]. A continuación, se presentan la TABLA 2.1 con algunas de las especies ecuatorianas encontradas y estudiadas por su contenido fenólico:

TABLA 2.1 PLANTAS MEDICINALES CON CONTENIDO FENÓLICOS EN ECUADOR

Especies	Familia	Nombre común
<i>Oreocallis grandiflora</i>	Proteaceae	Cucharilla
<i>Baccharis genistelloides</i>	Asteraceae	Carqueja, cuchu – cuchu
<i>Adiantum poiretii</i>	Pteridaceae	Culantrillo
<i>Artocarpus altilis</i>	Moraceae	Árbol de pan
<i>Stigmaphyllon eggersii</i>	Malpighiaceae	---
<i>Justicia colorata</i>	Acanthaceae	Arbusto andino
<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae	Ajenjo
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Euphorbiaceae	Chaya
<i>Cestrum aff auriculatum</i>	Asteraceae	Sauce, saúco
<i>Galinsoga parviflora</i>	Asteraceae	Pacoyuyu fino
<i>Oenothera tetráptera</i>	Onagraceae	Linda tarde
<i>Peperomia galioides</i>	Piperaceae	Jade
<i>Galium aparine</i>	Rubiaceae	Amor de hortelano
<i>Passiflora ampullacea</i>	Passifloraceae	Passiflora
<i>Ambrosia arborescens</i>	Asteraceae	Marco
<i>Lagurus ovatus</i>	Pcaceae	Cola de conejo
<i>Ilex guayusa</i>	Aquifoliaceae	Guayusa
<i>Potalia amara</i>	Loganiaceae	Cuararina, pau de cobra
<i>Salvia corrugata</i>	Lamiaceae	Salvia
<i>Scoparia dulcis</i>	Plantaginaceae	Escobilla
<i>Monnina sp.</i>	Polygalaceae	Muchuy, jupay. Chucru
<i>Alternanthera porrigens</i>	Amaranthaceae	Moradilla, verbena de monte
<i>Bactris gasipaes</i>	Arecaceae	Chonta
<i>Eugenia stipitata</i>	Mytaceae	Arazá
<i>Euterpe oleracea</i>	Arecaceae	Palma
<i>Myrciaria dubia</i>	Mytaceae	Camu – Camu
<i>Solanum sessiliflorum</i>	Solanaceae	Cocona

TABLA 2.1. (Continuación)

PLANTAS MEDICINALES CON CONTENIDO

FENÓLICOS EN ECUADOR

Especies	Familia	Nombre común
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Malvaceae	Cacao blanco
<i>Mauritia flexuosa</i>	Arecaceae	Palma de moriche
<i>Chuquiraga jussieui</i>	Asteraceae	Chuquiraga
<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	Llantén
<i>Apium graveolens</i>	Apiaceae	Apio
<i>Aloysia citrodora</i>	Verbenaceae	Cedrón
<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae	Ruda
<i>Equisetum giganteum</i>	Equisetaceae	Cola de caballo
<i>Mentha piperita</i>	Limniaceae	Toronjil
<i>Urtica urens</i>	Urticaceae	Ortiga
<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	Menta
<i>Dpuntia soederstromiana</i>	Cactaceae	Tuna
<i>Dodonaea viscosa</i>	Sapindaceae	Chamiza
<i>Mauritia flexuosa</i>	Arecaceae	Morete
<i>Cnidioscolus aconitifolius</i>	Euphorbiaceae	Chicasqui
<i>Helenium mexicanum</i>	Asteraceae	Cabezona, chapuz
<i>Portulaca aleracea</i>	Purtulacaceae	Verdolaga
<i>Vaccinium floribundum</i>	Ericaceae	Mortiño
<i>Salvia rosmarinus</i>	Lamiceae	Romero
<i>Rubus glaucus</i>	Rosaceae	Mora
<i>Zea mays</i>	Poaceae	Maíz
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Fréjol
<i>Amaranthus quitensis</i>	Amaranthaceae	Amaranto
<i>Tuberosum andigenum</i>	Solanaceae	Papa
<i>Solanum betaceum</i>	Solanaceae	Tomate de árbol
<i>Aloysia citrodora</i>	Verbenaceae	Hierba luisa
<i>Psidium guayaquilense</i>	Myrtaceae	Guayabo
<i>Piscidia carthagenensis</i>	Fabaceae	Árbol de madera
<i>Psidium rostratum</i>	Mytaceae	Picuda
<i>Ruellia floribunda</i>	Acanthaceae	Petunia silvestre
<i>Simira ecuadorensis</i>	Rubiaceae	Guapala
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	Anacardo
<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	Yuca
<i>Verbena litoralis</i>	Verbenaceae	Verbena
<i>Musa cavendish</i>	Musaceae	Banano
<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	Platano malayo
<i>Musa paradisiaca</i>	Musaceae	Platano maduro
<i>Conyza bonariensis</i>	Asteraceae	Rama negra
<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Orégano
<i>Moringa oleifera</i>	Moringaceae	Moringa
<i>Matricaria chamomilla</i>	Asteraceae	Manzanilla
<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Limonaria
<i>Cynara scolymus</i>	Asteraceae	Alcachofa

Nota: Se enumera plantas medicinales que contienen compuestos fenólicos, encontradas en investigación bibliográfica en la costa sierra y amazonía ecuatoriana [21]

2.3 Métodos de Separación y Análisis de Polifenoles y Flavonoides

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos y flavonoides hacen que su análisis sea fundamental para comprender la química de los alimentos y el desarrollo de nuevos productos farmacológicos basado en la naturaleza. A continuación, se describen los métodos de análisis utilizados, divididos en técnicas tradicionales y modernas [5].

2.3.1 Métodos Tradicionales

- a) Métodos Colorimétricos y de Precipitación (fitoquímicos): también conocidos como métodos de screening fitoquímico, entre ellos podemos mencionar: Prueba de Shinoda (Reacción de Mg-HCl), en esta los flavonoides reducen los cationes de magnesio en un medio ácido, formando complejos coloreados (rojo, rosa o naranja) que precipitan durante el ensayo; Prueba con el reactivo Cloruro de Aluminio (AlCl_3), Los flavonoides forman complejos amarillos con AlCl_3 debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura [22].
- b) Cromatografía en Papel: Se vale de la diferencia de solubilidad y afinidad con el papel para separar los flavonoides[23]
- c) Cromatografía en Columna: se utiliza un medio sólido para separar los compuestos por su polaridad, permitiendo la elución y análisis individual de cada fracción [24].

2.3.2 Métodos Modernos

- a) Cromatografía de Gases y Líquidos (GC y LC)
 - Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC): De los métodos más eficaces para la separación y cuantificación de polifenoles y flavonoides. Utiliza columnas rellenas que permiten la separación de forma muy precisa y rápida. La detección es posible mediante espectrometría de masas (MS) o detectores UV-Vis.

- Cromatografía de Gases (GC): No es habitual que se utilice para polifenoles debido a que son a menudo térmicamente inestables. Sin embargo, se puede utilizar tras una derivatización que los haga volátiles [25].

b) Espectroscopía

- Espectroscopía UV-Vis: Se utiliza para cuantificar compuestos que absorben en la región ultravioleta o visible. Es rápida y sensible, ideal para análisis cuantitativos [26].
- Espectrometría de Masas (MS): acoplada a HPLC, provee información estructural sobre los compuestos, lo que permite su identificación exacta y cuantificación [26].

–

c) Métodos Electroquímicos

Las técnicas electroquímicas, como la voltamperometría diferencial de pulsos, son utilizadas para la detección de flavonoides. Estas técnicas miden la corriente generada por la oxidación o reducción de los compuestos en un electrodo, proporcionando información sobre su concentración [27].

2.4 Ventajas y Limitaciones de la Espectroscopía UV-Vis

a) Ventajas:

- Sensibilidad y Rapidez: Permite detectar compuestos en bajas concentraciones (alta sensibilidad) en un corto tiempo de ensayo, lo que se traduce en menor uso de recursos y número de preparaciones de muestras en comparación con otros métodos analíticos.
- Simplicidad en el Protocolo: La preparación de muestras requerida para el análisis por espectroscopia UV-Vis son por lo general simples en comparación con técnicas complejas como la cromatografía. Esto la hace viable para su uso en laboratorios con recursos limitados.
- Cuantificación Directa: Permite la cuantificación directa de compuestos mediante la medición de la absorbancia a longitudes de onda específicas. Esto es ideal para polifenoles y flavonoides ya que tienen picos de absorción bien definidos.

- Versatilidad: Puede utilizarse para analizar una amplia variedad de compuestos que absorben en la región UV-Vis [26].

b) Limitaciones:

- Interferencias de Otros Compuestos: La precisión y exactitud de los resultados pueden verse afectados por la presencia de otros componentes en la muestra ya que pueden interferir en las lecturas de absorbancia. Esto se da a menudo en el análisis de matrices complejas, como extractos de plantas.
- Falta de Información Estructural: la determinación precisa de flavonoides y polifenoles en mezclas complejas no es posible dado que esta técnica no provee información sobre la estructura química de los compuestos, la cuantificación se da realizando ciertas asunciones basadas en el espectro UV.
- Limitación en la Detección de Ciertos Compuestos: Algunos polifenoles o flavonoides pueden no absorber en la región UV-Vis, lo que impide su detección mediante esta técnica [26].

2.5 Ventajas y Limitaciones de las Reacciones Fitoquímicas

a) Ventajas:

- Simplicidad y Bajo Costo: Los ensayos fitoquímicos suelen ser relativamente simples y económicos. No requieren equipos costosos y complejos, facilitando su implementación en estudios preliminares.
- Identificación Cualitativa: Las reacciones fitoquímicas permiten la identificación cualitativa de grupos de compuestos, lo que puede ser útil para una primera evaluación de la composición química de las muestras.
- Rápido y Directo: Estos métodos a menudo son rápidos, lo que permite obtener resultados en un corto periodo de tiempo [27].

b) Limitaciones:

- Cuantificación Menos Precisa: Lo que hace que sus resultados no sean reproducibles, esto hace de estos metodos útiles unicamente para la identificación y para tener una referencia de la cantidad presente en la muestra, debe ser complementado con una técnica más potente para cuantificación.
- Susceptibilidad a Variaciones Experimentales: Las condiciones experimentales suelen afectar significativamente los resultados. Imposibilidad de una comparación válida entre ensayos.
- Limitaciones en la Especificidad: Los ensayos fitoquímicos pueden no ser específicos para un compuesto particular, lo que puede generar confusiones o resultados [27].

2.6 Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC por sus siglas en inglés) o cromatografía de alta resolución es un método de análisis que involucra varios componentes físicos y químicos entre analito, fase móvil y columna para lograr la separación de los activos de interés de una matriz en específico.

El analito pasa por un proceso de extracción y purificación para finalmente ser disuelto en un diluyente y pasar a través de una columna o fase estacionaria mediante el bombeo a alta presión de la fase móvil líquida. Una vez la muestra tiene interacción con la fase móvil comienzan una serie de reacciones químicas y fisicoquímicas, el tiempo que tarda en efectuar la reacción a través de la fase estacionaria, es mejor conocido como tiempo de retención (T_r), el cual es único y puede referirse como un distintivo al momento de identificar el analito. El tiempo de retención, depende de la naturaleza del analito, de la capacidad de retención de la columna, la presión a la cual se ejecuta el análisis y la composición de la fase móvil, estas variables las podemos denominar como variables de distribución. Dichos componentes son lo que debemos modificar en caso de querer alterar el método de análisis seleccionado para lograr cambiar el equilibrio de las moléculas del analito. Sin embargo, si lo que se busca es mejorar la resolución mediante la selectividad del método se puede experimentar con las siguientes variables: El

solvente de la fase móvil, el pH de la fase móvil, cambio de la fase estacionaria y finalmente, cambio en la temperatura de la fase estacionaria [28].

2.7 Cromatografía en Fase Reversa

La cromatografía líquida era mayormente utilizada para separar componentes basándose en su polaridad, se buscaba que la fase estacionaria tuviera un carácter polar y la fase móvil como no polar o poco polar, bajo este método de separación se conoce a la cromatografía de fase normal. Sin embargo, durante la década del cincuenta se buscaba mejorar la selectividad de los métodos para muestras cuyos analitos predominantes fueran de carácter alifático o aromático. La propuesta para solventar este problema fue la cromatografía en fase reversa, (RPC, por sus siglas en inglés, Reverse Phase Chromatography). Como explica su nombre, este método cromatográfico tiene el comportamiento contrario al método en fase normal, es decir, en la fase estacionaria en este caso se predispone un comportamiento no polar o muy poco polar, mientras que la fase móvil muestra afinidad a la polaridad. Debido a que este tipo de cromatografía proporciona retención y selectividad óptima al tipo de analitos ya mencionados, es que se ha popularizado hasta el punto de convertirse hoy en días en la técnica más utilizada en el campo de la cromatografía líquida [29].

En la RCP se busca que la fase estacionaria sea una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido compuestos hidrofóbicos preparados con una sílica rígida que forman una mecánica de partículas resistentes, porosas y uniformes, teniendo la ventaja de soportar presiones aun más altas sin deformarse ni contraerse. No obstante, cuenta con la desventaja de ser químicamente inestable, como tal, tiene como limitante un rango de pH no menor a 3.0 y no mayor a 7.5, teniendo como consecuencia la disolución de la sílica en caso de no respetar los límites establecidos [30].

El mecanismo propuesto para el funcionamiento de este método dispone que los solutos no polares o poco polares casi no interactúan con las estructuras orgánicas de la fase móvil provocando que estas “abandonen” el medio, por tal motivo “la fuerza motriz de la retención no es la interacción favorable del soluto con la fase

estacionaria, sino el efecto de repulsión del disolvente por el soluto” [30]. Es decir que, la retención hidrofóbica del soluto a la fase estacionaria, puede disminuir al agregar un disolvente orgánico a la fase móvil, resolviendo que, conforme menos polar sea la fase móvil, menor será la adsorción de la muestra a la fase estacionaria.

2.8 Cromatograma

Se define como [31]: “Gráfico o tipo de presentación como respuesta de un detector, la concentración de un analito en el efluente y otra magnitud usada como medida de concentración en el efluente frente al mismo volumen del efluente o al tiempo”.

Los resultados de un análisis cromatográfico se visualizan y materializan en el cromatograma, el cual presenta 4 características importantes que ayudarán a describir e interpretar el comportamiento de la separación realizada.

- 1) Cada compuesto abandona la columna y es graficado por el detector con forma simétrica en una distribución Gaussiana, es decir, tienen forma de pico o campana.
- 2) Cada analito eluye de la columna en un tiempo dado (T_r), el cual puede ser usado para caracterizar o identificar el compuesto en estudio.
- 3) Cada pico se caracteriza por el valor de su anchura o área bajo la curva que permite su cuantificación. Dicha área se logra trazando tangentes que se extienden hasta tocar la línea base.
- 4) La forma Gaussiana del pico o la falta de ella, ayuda a identificar anomalías o posibles problemas que impidan que el método de análisis cumpla con los requisitos y parámetros para ser reconocido y validado para su uso.

Esta lista de características son fundamentales al momento de querer realizar un correcto análisis de resultados [31].

2.9 Equipo HPLC

Las características básicas de un cromatógrafo constan de:

- 1) Un puerto de muestreo e inyección que permita la recolección de la muestra mediante una aguja instrumental.
- 2) Una Fase móvil que arrastre la muestra desde la aguja recolectora hasta el final de la columna para terminar en el detector.
- 3) Un sistema de bombeo que logre impulsar el flujo de la fase móvil a través de la fase estacionaria.
- 4) Una fase estacionaria o columna que realice la separación de los componentes a analizar.
- 5) Un horno de columna que permita estabilizar la temperatura de trabajo.
- 6) Un detector que interprete las señales emitidas a una longitud de onda específica conforme el analito eluye de la columna.
- 7) Un procesador que transforme esa señal electrónica proveniente del detector en un cromatograma [32].

A continuación, en la Fig. 2.2 se aprecia un sistema de cromatografía líquida de alta resolución básico.

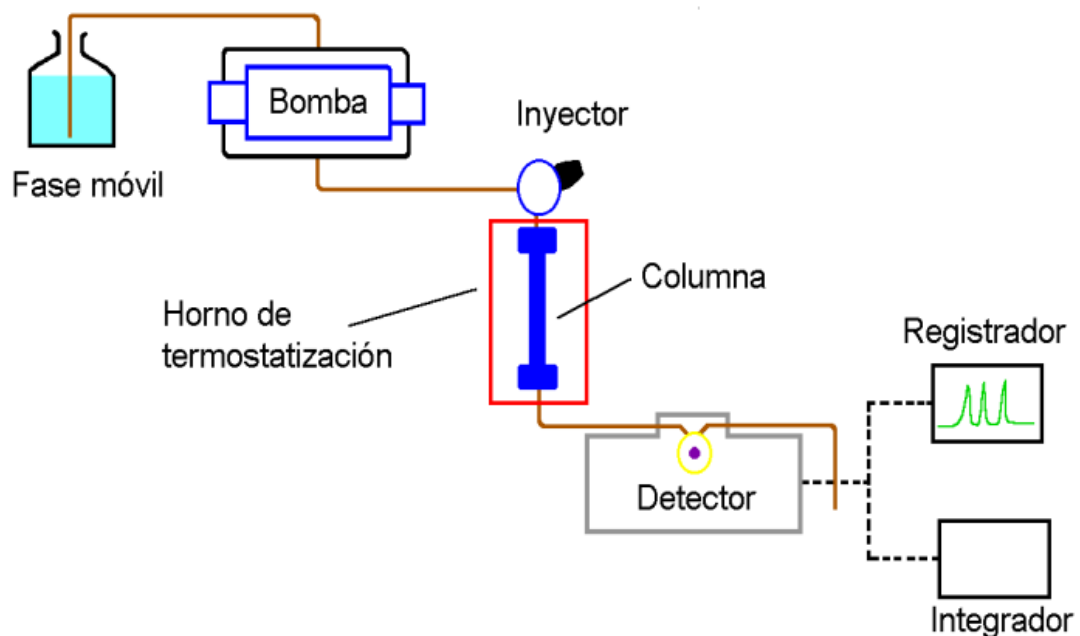


Fig. 2.2 Esquema de un cromatógrafo de líquidos. [33]

2.10 Aplicaciones de Métodos Cromatográficos en Fitoquímica.

Los métodos cromatográficos son fundamentales en fitoquímica para la separación, identificación y cuantificación de compuestos bioactivos en extractos vegetales. La cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en columna y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son técnicas ampliamente utilizadas. Estas metodologías permiten no solo la caracterización de los metabolitos secundarios, como polifenoles y flavonoides, sino también el análisis de la pureza de compuestos aislados. La HPLC, en particular, ha ganado prominencia debido a su capacidad para proporcionar separaciones eficientes y rápidas, lo que resulta crucial en la identificación de mezclas complejas presentes en los extractos vegetales [34].

2.11 Uso de HPLC en el Análisis de Extractos Vegetales

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides se lleva a cabo típicamente usando análisis HPLC con un detector de matriz de diodos UV-Vis (DAD). El *modus operandi* regular implica el aislamiento y la extracción de compuestos fenólicos de la matriz, seguido de una ejecución de HPLC usando una fase móvil de gradiente que consiste en dos o más reactivos, que son típicamente un solvente orgánico polar como metanol o acetonitrilo y un ácido débil como ácido fosfórico o acético. Los analitos luego se identifican y cuantifican por comparación con soluciones estándar. Si bien este método es perfectamente válido y preciso para ciertas matrices, puede resultar insuficiente para el análisis de productos como aceite de oliva, vino y miel, que contienen una variedad considerablemente grande de productos naturales, la mayoría de los cuales están relacionados químicamente y tienen polaridad similar. Esta técnica es especialmente valiosa en el estudio de fitocompuestos, que son de interés en aplicaciones farmacéuticas y nutraceuticas [1].

2.12 Validación de Métodos Analíticos

“La validación es la acción documentada que demuestra que cualquier procedimiento, proceso o actividad conducirá consistentemente a los resultados

esperados. Esto incluye la calificación de sistemas y equipamiento” [35]. La validación de un método es un requisito fundamental en la práctica del análisis químico. La validación es el “Proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones del método y la identificación de los aspectos influyentes que puedan cambiar estas características así como hasta que punto se puede cambiar” [35].

Este es un proceso basado en la confirmación del desempeño de un método de análisis y en los requerimientos de su aplicación. El desarrollador del método y el analista juegan un papel único y vital donde tiene la clara responsabilidad de lograr ejecutar una técnica de análisis que sea replicable, reproducible, robusta y lineal. De tal manera que logren dar validez al desempeño del método mediante la estimación de su incertidumbre [35].

Como parte de los programas de calidad y gestión de calidad, las empresas implementan nuevas metodologías y procesos enfocados en la mejora continua y para cumplir con este objetivo es que todo método deber ser validado o verificado por normativa para demostrar de forma documentada su idoneidad [36].

De forma general se pueden determinar 2 casos:

- 1) Que no sea un método nuevo de análisis. En caso de que el método sea rutinario no es necesario realizar una validación desde cero, puesto que se puede optar por realizar un análisis retrospectivo basado en los datos acumulados de la producción, pruebas y control. A partir de aquí se pueden combinar varios criterios de validación con la experiencia adquirida y así desarrollar y arrojar un análisis estadístico de los registros obtenidos por el método a lo largo del tiempo.
- 2) En contraposición, se encuentra la validación prospectiva, es decir, que se desarrolla con un producto, método o proceso nuevo. Este caso refiere también a métodos que hayan sido obtenidos a través de documentación no oficial o normativa. En caso de contar con un método normativo no es necesario validar sino solo verificar.

En muchos casos un método analítico es desarrollado y validado por el departamento de desarrollo o validación de la empresa para asegurar que el laboratorio que aplique el método sea capaz de entregar y reportar resultados confiables y veraces. En caso de que la validación haya sido realizada fuera de las instalaciones del laboratorio que lo utilizará se recomienda realizar una transferencia del método o de la validación [36].

Para métodos cromatográficos, las transferencias de métodos suelen constar en la comparación de los resultados de las pruebas realizadas durante la validación. Este análisis en paralelo entre 2 o varias muestras de concentraciones conocidas, permiten delimitar la aplicación del método o realizar adecuaciones específicas que el laboratorio solicite ya sea por el tipo de cromatógrafo que manejen, la equivalencia de la columna o el tipo de detector. Estas adecuaciones pueden y deben realizarse siempre dentro de un rango previamente especificado en la validación [34].

Como punto extra, dentro de los casos para realizar validaciones, también se pueden nombrar las revalidaciones, es decir, aquellos métodos validados que con el paso del tiempo han sido modificados de manera instrumental, por la matriz del analito o la proporción del activo a cuantificar.

2.13 Clasificación de la Validación

Como se mencionó los métodos de validación se clasifican como Normalizados y No Normalizados de acuerdo con lo siguiente:

- A) Métodos Normalizados: Son aquellos ya existentes que constan en el siguiente ejemplo de estancias.
 - 1) Primera Instancia
 - i) Normas Oficiales del País de Referencia
 - ii) Farmacopeas Oficiales
 - 2) Segunda Instancia
 - i) Environmental Protection Agency (EPA)

- ii) Pesticide Analytical Manual (PAM)
- iii) Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC)
- iv) United States Pharmacopeia (USP)
- v) British Pharmacopeia (BP)
- vi) American Society for Testing and Materials (ASTM)
- vii) International Organization for Standardization (ISO)
- viii) Food and Drug Administration (FDA)
- ix) Food and Agriculture Organization (FAO)
- x) European Commission (CE)
- xi) United States Department of Agriculture (USDA)
- xii) Entre otros.

B) Métodos no normalizados: Corresponden a los métodos desarrollados por los laboratorios o métodos publicados en revistas científicas. En esta categoría se pueden adjuntar aquellos métodos de análisis comúnmente utilizados por las empresas pero que no están normalizados [37].

2.14 Parámetros de Validación

Una Validación de método cuenta con varios parámetros y criterios que deben ser analizados y comprobados para que esta tenga validez. Dichos parámetros van a depender del tipo de validación que se desee hacer, pero sobre todo del equipo con el cual se está realizando la validación[37].

A continuación, la TABLA 2.2. se detalla el tipo de pruebas utilizadas dependiendo del método o equipo de análisis.

TABLA 2.2 PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN A SOLO PARA ANÁLISIS A NIVEL DE TRAZAS (PPN,PPB,PPT)

Parámetro de desempeño	Tipo de prueba					
	Espectrofotométrica	Cromatográfica	Potenciométrica	Volumétrica	Gravimétrica	Física
<i>Intervalo lineal y de trabajo</i>	SI	SI	SI	SI	SI	NO
<i>Límite de detección</i>	SI ^a	SI ^a	NO	NO	NO	SI
<i>Límite de cuantificación</i>	SI ^a	SI ^a	SI ^a	SI ^a	SI ^a	NO
<i>Recuperación</i>	SI	SI	NO	SI	SI	NO
<i>Sesgo</i>	SI	SI	SI	SI	SI	NO
<i>Repetibilidad</i>	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
<i>Reproducibilidad</i>	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
<i>Incertidumbre</i>	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
<i>Sensibilidad</i>	SI ^d	SI ^d	SI ^{d,e}	SI ^e	SI ^d	NO
<i>Selectividad</i>	SI ^d	SI ^d	SI ^{d,e}	SI	SI	SI ^b
<i>Robustez</i>	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d

Nota: tabla de discriminación de parámetros de validación de métodos .[38]

Donde se entiende que:

- ^a Solo para análisis a nivel de trazas (ppm, ppb, ppt)
- ^b Solo métodos cualitativos
- ^c solo métodos cuantitativos
- ^d solo para métodos no normalizados
- ^e solo para el análisis por ion selectivo

2.14.1 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que sean directamente proporcionales a la concentración esperada del analito dentro de un rango definido[38]. Este parámetro se determina mediante un tratamiento matemático realizando una curva del analito bajo diferentes concentraciones y se expresa bajo la siguiente ecuación:

$$Y = mx + b$$

Donde:

m es la pendiente de la curva y representa la sensibilidad de la calibración del método. Expresada en unidades de concentración del analito.

b es la ordenada al origen, es decir, el intercepto de la curva a el eje x. Es el estimador que relaciona la presencia de interferencias o errores sistemáticos.

2.14.2 Límite de Detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ)

LOD y LOQ por sus siglas en inglés se determinan por las siguientes ecuaciones[38]:

$$LOD = \frac{3.3 DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta
S = Pendiente de calibración de la curva

$$LOQ = \frac{10DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta
S = Pendiente de calibración de la curva

2.14.3 Selectividad

Se lo define como la capacidad que tiene un método analítico para medir de forma exacta y específica la presencia del analito en la muestra de análisis y determinar que este emite una sola respuesta[38].

2.14.4 Precisión

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de datos se asemejan entre sí[38]. La precisión se expresa como la desviación estándar y se calcula como:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde: n = numero de medidas

X_i = Valor medio en el ensayo

$\bar{X}$ = Estima la media poblacional

2.14.5 Repetibilidad

Ayuda a estimar la precisión del método siempre y cuando se desarrolle bajo las mismas condiciones utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista en el mismo laboratorio, con los mismos equipos, reactivos e instrumentos. Se puede determinar realizando varias determinaciones a una misma muestra o realizando varias determinaciones a muestras de cantidades conocidas [38].

La desviación estandar o el coeficiente de variación es quien caracteriza a este parámetro[38]. Tambien permite evaluar el error aleatorio correspondiente a la dispersión de los datos, se calcula como:

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) * 100$$

Donde S = es la desviación estandar

2.14.6 Reproducibilidad

Representa que tan precisos resultaron los ensayos sobre una misma muestra por diferentes analistas en días distintos y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la reproducibilidad. El coeficiente resultante debe ser igual o mayor al obtenido en el estudio de repetibilidad [38].

2.15 Importancia de la Validación de Métodos para Asegurar la Calidad y Precisión de los Resultados en Investigaciones Fitoquímicas

La validación de métodos analíticos es un proceso esencial para asegurar la calidad y precisión de los resultados en investigaciones fitoquímicas. Este proceso incluye la evaluación de parámetros como la especificidad, la linealidad, la precisión, la exactitud y el límite de detección y cuantificación. La validación garantiza que los métodos utilizados sean adecuados para el propósito previsto, minimizando errores y variaciones en los datos. En fitoquímica, donde la heterogeneidad de las muestras puede influir en los resultados, la validación rigurosa es crucial para establecer la fiabilidad de los análisis y permitir comparaciones significativas entre estudios. Además, la validación de métodos contribuye al cumplimiento de normativas y estándares de calidad, lo que es fundamental para la aceptación de resultados en el ámbito científico y regulatorio [39].

2.16 Importancia de la Biodiversidad de Ecuador en la Investigación de Biocompuestos

Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo, y su flora presenta un vasto potencial para la investigación de biocompuestos. La diversidad de ecosistemas, desde bosques tropicales hasta montañas andinas, alberga una rica variedad de especies vegetales, muchas de las cuales son endémicas y poseen metabolitos secundarios únicos[7]. Estos compuestos bioactivos pueden ofrecer nuevas oportunidades en el desarrollo de fármacos, antimicrobianos y antioxidantes, contribuyendo así a la medicina tradicional y a la biotecnología moderna. La investigación sobre la biodiversidad ecuatoriana no solo enriquece el

conocimiento científico, sino que también promueve la conservación de los ecosistemas y la utilización sostenible de los recursos naturales [40].

La investigación fitoquímica en esta biodiversidad permite no solo el descubrimiento de nuevos compuestos, sino también la comprensión de sus mecanismos de acción y potenciales aplicaciones en la salud humana. El estudio sistemático de estas especies podría conducir a la identificación de nuevos candidatos para el desarrollo de medicamentos [40].

2.17 Relevancia del Estudio de Extractos Vegetales en el Contexto Local y Global

El estudio de extractos vegetales es de gran relevancia tanto en el contexto local como global. A nivel local, la investigación en fitocompuestos puede contribuir al desarrollo de la medicina tradicional y a la promoción de prácticas agrícolas sostenibles, beneficiando a las comunidades que dependen de estos recursos. A nivel global, el creciente interés en los productos naturales y su potencial como fuentes de fármacos y nutraceuticos resalta la importancia de las investigaciones en fitoquímica. Además, el estudio de extractos vegetales proporciona información valiosa sobre la interacción entre las plantas y su entorno, contribuyendo a la sostenibilidad y conservación de la biodiversidad. Este enfoque multidimensional enfatiza la necesidad de integrar la investigación científica con la conservación de recursos naturales y el desarrollo comunitario [40].

CAPÍTULO 3

3 METODOLOGÍA

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

La investigación desarrollada es aplicada porque busca resolver un problema práctico relacionado con la cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos vegetales. También se puede clasificar como experimental ya que se realizan pruebas controladas en el laboratorio para validar el método analítico. Por otra parte, en cuanto al nivel de conocimiento, describe los métodos y resultados obtenidos por lo que se clasifica como una investigación descriptiva y además, busca entender las causas y efectos en la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos clasificándola como explicativa.

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño de esta investigación es experimental. Este diseño es adecuado porque permite manipular variables y controlar condiciones en el laboratorio para evaluar la eficacia del método. La investigación se estructuró en las siguientes fases:

1. Revisión de literatura y normativas: Análisis de normativas, estándares y metodologías relevantes para la cuantificación de polifenoles y flavonoides.
2. Desarrollo del método HPLC: Diseño y optimización del método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con arreglo de diodos.
3. Validación del método: Evaluación de parámetros de validación como especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación y reproducibilidad.
4. Aplicación del método: Implementación del método en el análisis de extractos vegetales.
5. Evaluación de resultados: Comparación de los resultados obtenidos con estándares de referencia y análisis estadístico de la precisión y exactitud del método.
6. Documentación y reporte: Registro detallado de los procedimientos, resultados y conclusiones para asegurar la transparencia y reproducibilidad del estudio.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

- Variable independiente: Método de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) con arreglo de diodos.
- Variable dependiente: Concentración de nueve analitos (Ácido gálico, Ácido clorogénico, Ácido cafeico, Ácido Sirínico, Ácido P-coumárico, Rutina, Quercetina, Naringenina, Kaempferol) en extractos vegetales.

3.2.2 Diseño experimental

El proceso experimental incluye los siguientes pasos:

- a. Desarrollo del método UHPLC: Optimización de los parámetros de la técnica de UHPLC con arreglo de diodos para asegurar la sensibilidad y precisión necesaria para la cuantificación de polifenoles y flavonoides. Se acudió a la bibliografía de metodologías para el análisis de los analitos de interés en matrices similares; se buscó obtener un método capaz de identificar y cuantificar los analitos de una manera satisfactoria.
- b. Validación del método: Realización de ensayos para evaluar los parámetros de validación, incluyendo:
 - Especificidad: Capacidad del método para distinguir y cuantificar los compuestos de interés sin interferencias.
 - Linealidad: Verificación de la respuesta lineal del método en el rango de concentración de interés.
 - Precisión: Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método.
 - Exactitud: Comparación de los resultados obtenidos con materiales de referencia certificados.
 - Límite de detección y cuantificación: Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.
- c. Análisis de datos: Interpretación y análisis estadístico de los resultados obtenidos para verificar el cumplimiento de los parámetros de validación.

- d. Documentación y reporte: Registro detallado de todos los procedimientos, resultados y conclusiones del estudio para asegurar la transparencia y la reproducibilidad.

3.2.3 Recolección de datos

3.2.3.1 Métodos y técnicas

3.2.3.1.1 Metodología analítica para la cuantificación de polifenoles y flavonoides en extracto vegetal.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un sistema UPLC marca Waters con sistema ACQUIT Premier con detector TUV. La columna cromatográfica empleada fue una columna ACQUITY Premier BEH C18 Column, 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm, 1/pk. La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fórmico al 0,1 % en agua (A) y Acetonitrilo (D), con un flujo de 0,5 ml/min durante todo el gradiente y el volumen de inyección fue de 2 μ L. La temperatura de la columna se estableció en 35°C. El tiempo de corrida es de 10 minutos, el tiempo de retención para cada analito en las condiciones del método fue:

TABLA 3.1 TIEMPOS DE RETENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	
Analito	Tiempo de retención (min)
Ácido gálico	0,42
Ácido clorogénico	1,40
Ácido cafeico	1,58
Ácido siríngico	1,76
Ácido p-coumárico	2,19
Rutina	2,65
Quercetina	3,95
Naringenina	4,43
Kaempferol	4,58

Nota: Los tiempos pueden variar en un $\pm$ 10%

Al ser una metodología tipo screening se esperó una variación en los tiempos de retención de los compuestos no mayor al 5%

3.2.3.1.1.1 Preparación de fase móvil, muestras y estándares.

Ácido fórmico 0,1%

Se colocó 1 ml de ácido fórmico en un balón aforado de 1000 ml, luego se diluyó y aforó con agua tipo II. Se filtró, desgasificó y colocó en el equipo UPLC.

Acetonitrilo

Se colocó 1 litro de acetonitrilo en una botella Boeco, se desgasificó y se colocó en el equipo UPLC.

Solución Isopropanol/agua (IPA) 50:50

Se colocó agua tipo II e isopropanol en partes iguales para preparar 500 ml. Se filtró, desgasificó y colocó en el equipo UPLC.

Preparación de la matriz

Se pesó 1,72 g de anís previamente secado y se colocó en un vaso de precipitado con 150 ml de metanol, se calentó a 50°C, se sonicó por 10 minutos, se filtró y se dejó enfriar y luego se diluyó en un matraz aforado de 250 ml con metanol. Finalmente, se filtró con filtro de jeringa 0,22 µm.

Preparación de curva de calibración en solvente y matriz

Se preparó directamente en viales de 1,5 ml que se llevaron al cromatógrafo.

Para la concentración de 0,5 ppm, se tomó 25 µL del estándar de los 9 analitos y completar el volumen con 975 µL ya sea de solvente o matriz.

Para la concentración de 1 ppm, se tomó 50 µL del estándar de los 9 analitos y completar el volumen con 950 µL ya sea de solvente o matriz.

Para la concentración de 1,5 ppm, se tomó 75 µL del estándar de los 9 analitos y completar el volumen con 925 µL ya sea de solvente o matriz.

Para la concentración de 2 ppm, se tomó 100 µL del estándar de los 9 analitos y completar el volumen con 900 µL ya sea de solvente o matriz.

Para la concentración de 2,5 ppm, se tomó 125 µL del estándar de los 9 analitos y completar el volumen con 875 µL ya sea de solvente o matriz.

Para la concentración de 3 ppm, se tomó 150 µL del estándar de los 9 analitos y completar el volumen con 850 µL ya sea de solvente o matriz.

3.2.3.1.2 Procedimiento para la validación del método para la determinación de polifenoles.

La validación se realizó basado en los siguientes parámetros propuestos por la ICH [37]: Especificidad, linealidad/rango de trabajo, exactitud y precisión (repetibilidad).

TABLA 3.2 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Requisito de desempeño	Criterio de aceptación
Especificidad	No hay interferencia cromatográfica con los analitos de estudio. Resolución ≥ 1
Linealidad y rango de trabajo	Coeficiente de correlación ≥ 0.99 Análisis residuales: aleatoriedad $F_{cal} < F_{Crítico}$
LOD	$LOD < 50\% LC$
LOQ	$LOQ \leq 50\%$ valor medio
Efecto matriz	Coeficiente de correlación ≥ 0.99 matriz. Coeficiente de correlación ≥ 0.99 solvente. $F_{cal} < F_{crítico}$ $t_{cal} < t_{crítico}$
Exactitud	Porcentaje de recobro entre 90-110%
Precisión (Repetibilidad)	$RSD \leq 10\%$

Nota: los criterios definidos se adaptaron para el ensayo del trabajo de titulación

3.2.3.1.2.1 Especificidad

Se realizó el análisis de los nueve analitos utilizando Material de Referencia Certificado (MRC) agregados a la matriz y solvente (metanol), por triplicado por cinco días en la concentración objetivo (1,5 mg/l).

Para el criterio de aceptación se comparó las lecturas (señal de medición) obtenidas tanto en solvente como en matriz y se evaluó de manera visual en los cromatogramas que no haya interferencia y mediante el cálculo de la resolución de los picos visualmente más cercanos, cuyo criterio de aceptación fue que dicha

resolución sea mayor o igual a 1. La resolución se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2(W_{b2} + W_{b1})}$$

Donde: T_{ri} : tiempo de retención del compuesto "i"

W_{bi} : Anchura de pico a la mitad de la altura

3.2.3.1.2.2 Linealidad y rango de trabajo

La determinación del rango lineal se realizó evaluando 6 niveles de concentración durante 5 días de análisis, con las siguientes concentraciones: 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, 2,5 mg/l y 3 mg/l.

Para la preparación de las disoluciones estándar se pesó exactamente 5 mg de cada MRC de los nueve analitos en nueve matraces volumétricos de 5 ml diferentes, y posteriormente se enrasó con metanol; finalmente se transfirió cada una de las disoluciones preparadas a viales ámbar. Estas fueron nuestras soluciones stock usadas como estándar.

De cada una de las nueve soluciones stocks estándar se tomó 0,5 ml, se diluyó en matraces de 5 ml para obtener nueve soluciones intermedias de 100 mg/l.

En un matraz de 10 ml se tomó 1 ml de cada solución intermedia, se mezcló y enrasó con metanol para obtener concentraciones de 10 ppm de cada analito.

Posteriormente de la disolución anterior se realizó las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, 2,5 mg/l y 3 mg/l de solución mezcla conteniendo los nueve analitos.

Para el Criterio de aceptación se utilizó el método de mínimos cuadrados con la finalidad de obtener la recta de regresión lineal, donde la concentración (eje de abscisas) y la respuesta instrumental (eje de ordenadas) debe tener un coeficiente de correlación R^2 mayor o igual a 0.99.

Además, se evaluó los puntos experimentales de la curva de regresión lineal medidas en la dirección paralela al eje de las ordenadas, con graficas de análisis

residual, que deberán estar aleatoriamente distribuidos indicando de esta manera un grado de linealidad. Si por el contrario los puntos siguen una tendencia determinada, al no estar regularmente distribuidos a ambos lados de la coordenada X, se pondrá en duda la linealidad.

3.2.3.1.2.3 Efecto matriz

Se realizó la evaluación en seis niveles durante 3 días de los nueve analitos con MRC fortificadas en matriz y solvente en las siguientes concentraciones: 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, 2,5 mg/l y 3 mg/l.

Para el criterio de aceptación el coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.99$ en las curvas tanto del solvente como de la matriz fortificada. Al comparar la curva de calibración estándar en solvente, con la curva de adición en matriz; las pendientes de ambas curvas deben ser similares, se utiliza la herramienta estadística de análisis de varianza, la cual, nos permite hacer esta comparación bajo la premisa de hipótesis nula que indica que no hay diferencias significativas entre las dos si, $F_{cal} < F_{crítico}$.

3.2.3.1.2.4 Límite de detección LOD

El límite de detección se determinó analizando la matriz fortificada por triplicado, se integró áreas correspondientes a cada analito y luego se obtuvo la concentración usando la ecuación de la curva de cada analito. el cálculo se realizó teniendo en cuenta el valor promedio de la señal, mediante la siguiente ecuación.

$$LOD = \frac{3.3 DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta
S = Pendiente de calibración de la curva

Para el criterio de aceptación el LOD debe ser menor al 50% de LOQ.

3.2.3.1.2.5 Límite de cuantificación LOQ

El límite de cuantificación se determinó analizando la matriz fortificada por triplicado, se integró las áreas correspondientes a cada analito y luego se obtuvo la

concentración usando la ecuación de la curva de cada analito. el cálculo se realizó teniendo en cuenta el valor promedio de la señal, mediante la siguiente ecuación.

$$LOQ = \frac{10DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta

S = Pendiente de calibración de la curva

Para el criterio de aceptación el LOQ debe ser $\leq$ al 50% del valor medio.

3.2.3.1.2.6 Exactitud

Se evaluó en dos niveles de concentración: 1,5 y 3 mg/l, por triplicado durante 5 días; utilizando MRC en la matriz. Se calculó el porcentaje de recobro, mediante la ecuación:

$$R = \left(\frac{Ce - Co}{Ca} \right)$$

Donde: R = Recuperación

Ce = Concentración del analito de la muestra enriquecida

Co = Concentración del analito medida en la muestra sin adicionar

Ca = Concentración del analito adicionado a la muestra enriquecida

Y el Porcentaje de recobro %R se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%R = R \times 100$$

Para el Criterio de aceptación, el porcentaje de recuperación debe estar entre 90 y 110%. También se puede establecer como criterio un RSD ≤ 10 .

3.2.3.1.2.7 Precisión.

Se preparó 3 soluciones de trabajo diarias en dos concentraciones (1,5 y 3 mg/l) durante 5 días.

La Repetibilidad se estudió para cada día en el mismo laboratorio, con el mismo analista y día. Se calculó el promedio de las tres soluciones para las dos concentraciones, y la desviación estándar relativa RSD de cada uno.

Para el Criterio de aceptación el RSD debe ser ≤ 10 .

3.2.3.2 Recursos

3.2.3.2.1 Equipos, materiales y reactivos

Equipo

- Sistema UPLC marca Waters con sistema ACQUIT Premier con detector TUV.
- Balanza Sartorius. (0.0001g)
- Bomba al vacío Faithful.

Material de referencia

- Ácido gálico MKBB3608 Lote: 398225-100g.
- Ácido clorogénico 079k0991 Lote: C3878-250mg.
- Ácido cafeico SLBX6888 Lote: C1778-1VL.
- Ácido Siríngico 079K1501 Lote: S6881-5g.
- Ácido P-coumárico BCCG8417 Lote: C9008-1g.
- Rutina BCBW7626 Lote: R5143-50g.
- Quercetina RO35PO Lote: 159-2409.
- Naringenina MKAA2821 Lote: W530098.
- Kaempferol BCCD4517 Lote: K0133-10mg.

Consumibles

- Columna ACQUITY Premier BEH C18 Column, 1,7 μm , 2,1 x 50 mm, 1/pk.
- Filtros de jeringa de PVDF 25 mm x 0.2 μm .
- Filtros de membrana PVDF 47 mm x 0.22 μm .
- Material de Vidrio de uso común en el laboratorio.
- Equipo de filtración 1000 ml Sartorius Stedim
- Viales de 1.5 ml con tapa rosca.
- Viales ámbar de 1.5 ml con tapa rosca.

- Micropipeta mono canal Thermo Scientific 100- 1000 µl.
- Micropipeta mono canal Brand 20- 200 µl.
- Puntas para micropipeta 100- 1000 µl.
- Puntas para micropipeta 20- 200 µl.
- Matraces de vidrio aforados de 5 ml, 10 ml, 25 ml, 1000 ml.
- Ultrasonido digital Fisher Scientific.

Reactivos

- Metanol grado HPLC marca JTBaker Lote: C16W35.
- Agua tipo II.
- Ácido fórmico al 85% marca IsoLab Chemicals.
- Isopropanol Marca Lobachemie Lote: LG22471303
- Acetonitrilo Marca Mallinckrodt Lote: 2856 V01D52.

3.2.4 Análisis estadístico

Para los fines de esta validación se utilizarán cálculos estadísticos para establecer si el método se encuentra dentro de los parámetros de validación establecidos.

Media, media aritmética o promedio

$$X = \frac{\sum x_i}{n}$$

Donde: Xi = Valor de una lectura
n = Número de lecturas

Desviación estándar (S)

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}}{n - 1}$$

Donde: Xi = Valor de una lectura
n = Número de lecturas
X = Promedio del total de las lecturas

Coeficiente de variación (CV). También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Donde: S = Desviación estándar de las lecturas
X = Promedio del total de las lecturas

Varianza

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n - 1}$$

Donde: S = Desviación estándar de las lecturas
X = Promedio del total de las lecturas
Xi = Valor de una lectura

Pruebas de Significancia

Se utiliza prueba F- (de Fisher) para identificar errores aleatorios (precisiones). Mediante esta prueba se comprueba la veracidad de la hipótesis experimental llamada “hipótesis alternativa H1” (sin hay diferencia) con respecto a la “hipótesis nula Ho” no hay diferencia. Esta prueba será utilizada para comprobar si la hipótesis nula puede o no ser rechazada.

Si el valor de F calculado < F tabla se admite Ho

Análisis de varianza (ANOVA)

Para realizar el análisis e interpretación de los resultados, se emplearon herramientas estadísticas que son necesarias para interpretar y visualizar datos que deben ser relacionados, esto se llevó a cabo con el software Microsoft Excel. Mediante este análisis estadístico se comparó más de dos medias entre sí, y se pudo evaluar las diferencias entre y dentro de cada grupo. Se determinó el valor crítico de tabla para un $\alpha=0.05$ y se basó en que si el F calculado > F crítico habrá diferencias significativas.

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS

4.1 Desarrollo del método

Para poder cuantificar diferentes analitos de manera simultánea, se encontró en la revisión bibliográfica la aplicación de diferentes metodologías analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [3], espectrofotometría UV/Vis [41], titulación, pero no se ha logrado encontrar una metodología que cuantifique en específico los nueve analitos de nuestro estudio en matriz vegetal. Se tomó como referencia el estudio de Mizzi *et al.* [1] en 2020 que realizó la validación de un método de identificación de 15 compuestos fenólicos de los cuales coincide con 6 de los 9 del presente estudio utilizando un HPLC de Marca Waters y una columna C18, en dicho estudio se logró una adecuada separación de los analitos y se observó que ciertos compuestos fenólicos tienen picos con formas particulares. Zhang X. *et al.* [4] en 2022 utilizó metodología HPLC para evaluar la cuantificación de 7 especies fenólicas en una matriz compleja (miel).c El proceso que se adoptó para el desarrollo del método fue el siguiente:

4.1.1 Parámetros cromatográficos para el desarrollo de la metodología

Para desarrollar el método se decidió utilizar cromatografía líquida de ultra alta resolución, ya que es una técnica moderna de separación con capacidad para analizar multicomponentes en tiempo real y es compatible con las características de la muestra problema, además, tiene ventajas frente a otras tecnologías como menor tiempo de análisis de las muestras, mayor resolución, requiere menor cantidad y concentración de analitos y menor consumo de solvente. El equipo permite modificar gradientes, flujos, volumen de inyección, temperaturas, entre otros parámetros cromatográficos; siendo lo suficientemente versátil para adaptar en corto tiempo el método a nuestras necesidades [42].

4.1.2 Desarrollo de la metodología

Se buscó un método cromatográfico que permitiera la separación adecuada de cada analito preparado en solvente y además que permitiera la correcta separación de una mezcla de los nueve analitos en solvente, es decir, poder observar de forma legible cada pico de analito en el tiempo correspondiente con una forma y separación de pico adecuado[2].

Inicialmente se abordó este desarrollo estableciendo condiciones iniciales de separación mediante la búsqueda bibliográfica de métodos de separación UPLC implementados en equipo, analitos y matriz similares[2].

La primera metodología aplicada consistió en una fase móvil compuesta por dos solventes, el primero ácido fórmico al 0,1% y metanol grado HPLC. Con un tiempo de corrida de 5 minutos con el gradiente que se detalla en la TABLA 4.1.

TABLA 4.1 GRADIENTE PRIMER MÉTODO PROBADO

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A Ácido fórmico 0,1%	%B Metanol
0,00	0,6	80,0	20,0
1,70	0,6	67,5	32,5
3,97	0,6	30,0	70,0
4,08	0,6	80,0	20,0
4,42	0,6	80,0	20,0

Se procedió a preparar diez viales de 1,5 ml, uno por cada analito y el décimo con la mezcla de los nueve analitos preparado previamente, todos con una concentración de 2 ppm, obteniendo una buena señal en las inyecciones de los analitos individuales como se muestra en Fig.4.1, pero con picos coeluidos y con mala señal en el décimo cromatograma de la mezcla como se aprecia en la Fig. 4.2.

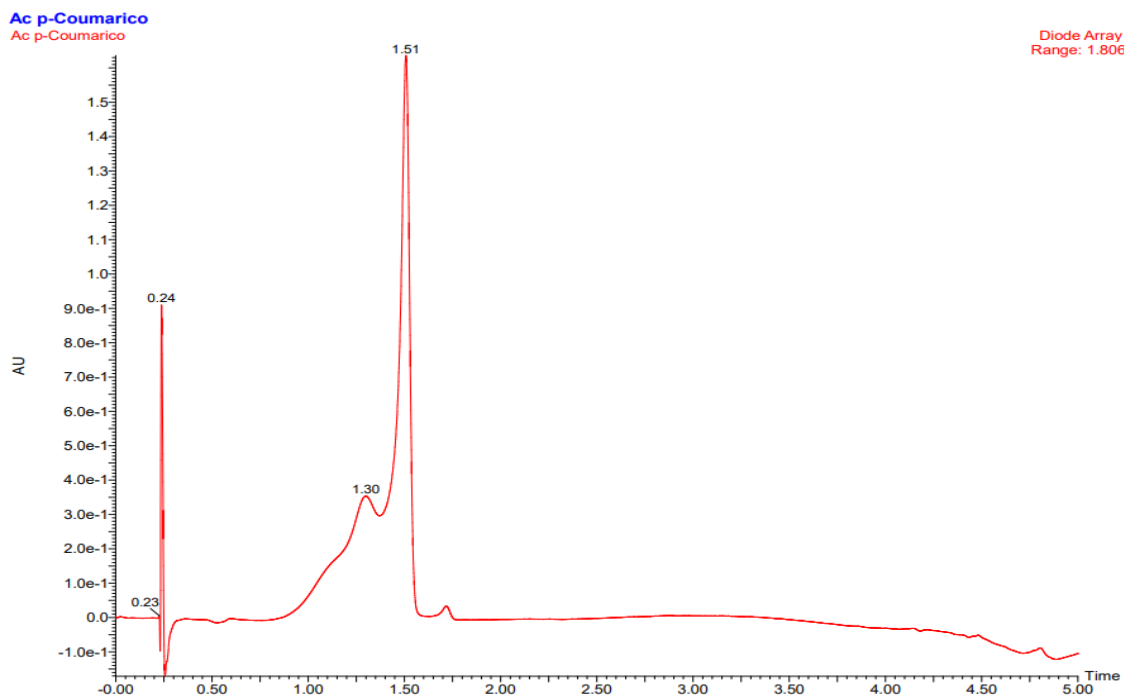


Fig. 4.1 Cromatograma ácido p-coumárico en condiciones de primer método probado.

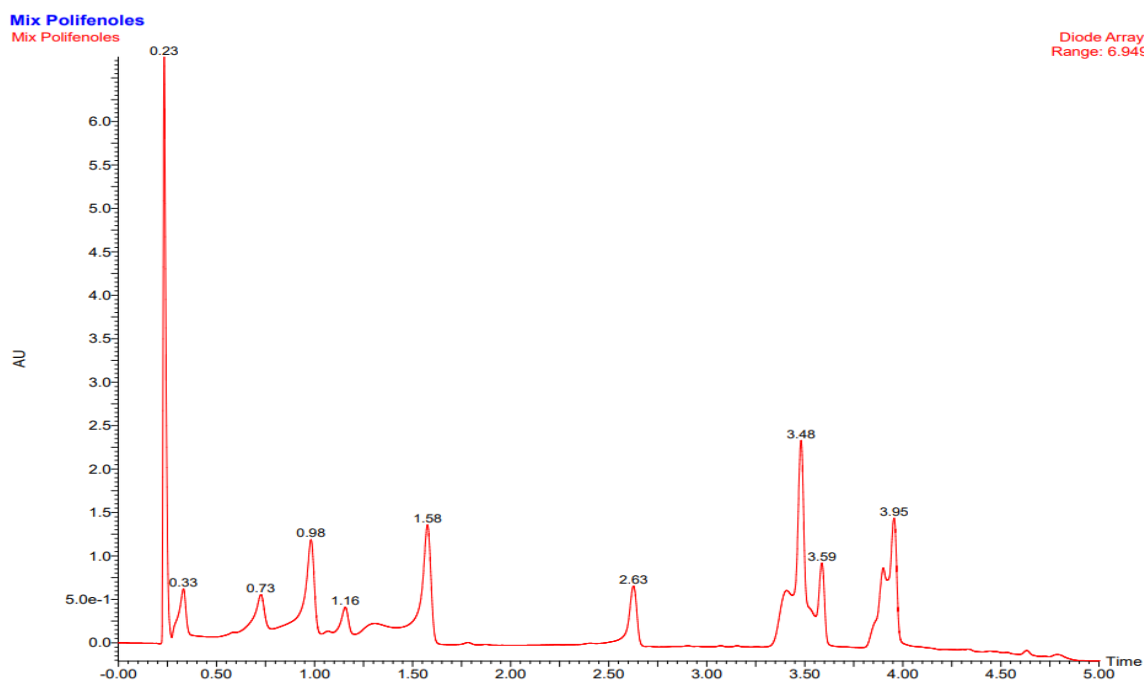


Fig. 4.2 Cromatograma de mezcla en condiciones de primer método probado.

Se decidió incrementar el tiempo de corrida a 8 minutos, extendiendo el gradiente al detallado en la TABLA 4.2 con la misma fase móvil buscando una mejor separación de picos, se analizaron los mismos 10 viales previamente preparados y no se obtuvo mejora significativa y la línea base se curvo hacía abajo a medida que avanzaba el tiempo como se evidencia en la Fig. 4.3.

TABLA 4.2 GRADIENTE SEGUNDO MÉTODO PROBADO

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A Ácido fórmico 0,1%	%B Metanol
0,00	0,4	80,0	20,0
7,0	0,4	10,0	90,0
8,0	0,4	80,0	20,0

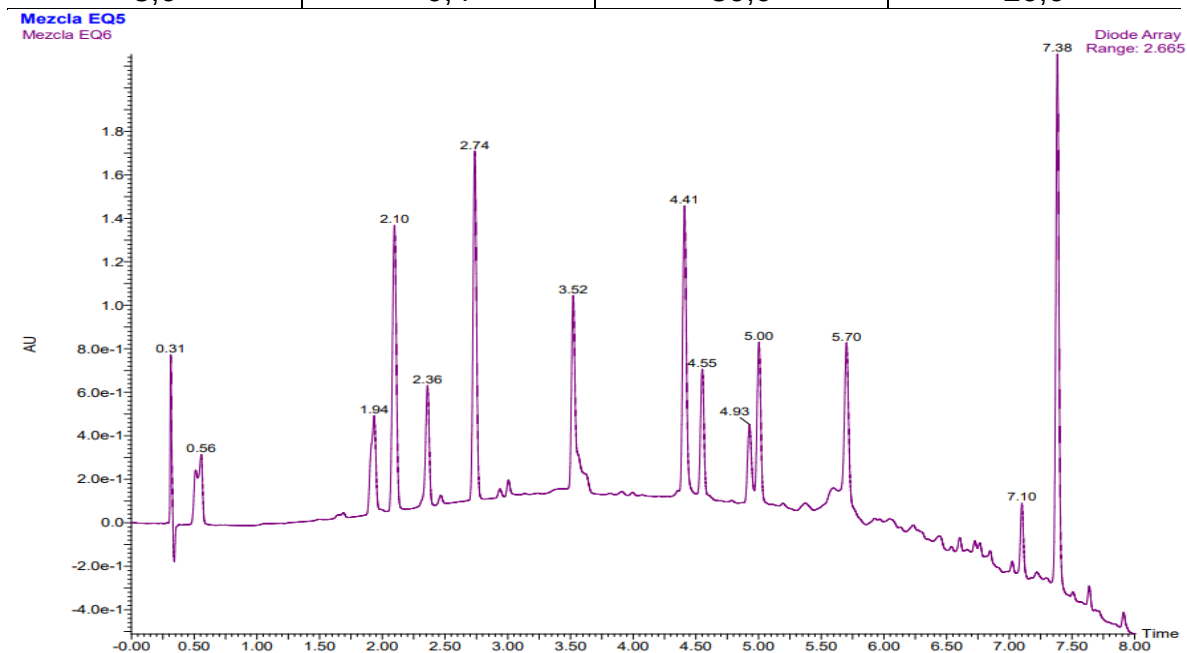


Fig. 4.3 Cromatograma de mezcla en condiciones del segundo método probado.

Basado en el estudio de Bajkacz et al. [42] se decidió reemplazar el metanol en fase móvil por acetonitrilo dado que reporta una mejora significativa en la resolución de muestras de polifenoles preparados en metanol. Además, el tiempo de corrida se aumentó a 10 minutos como lo reportaron. Se preparó nuevamente diez viales en la misma configuración con una concentración de 5 ppm y se procedió a realizar inyecciones de 3,5 μ L.

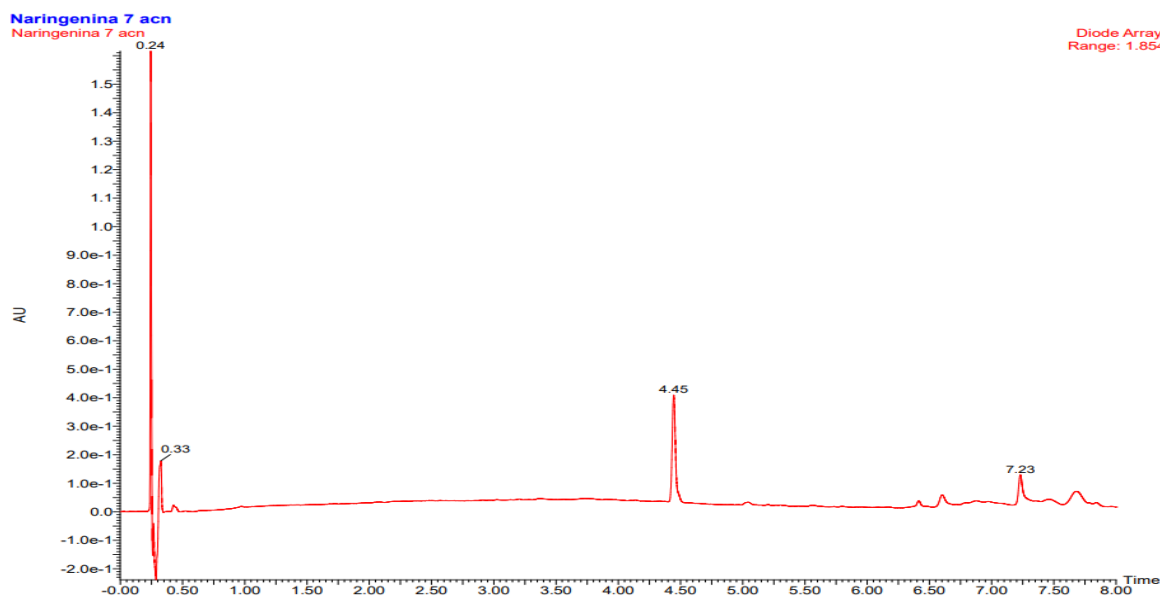


Fig. 4.4 Cromatograma Naringenina en condiciones de método óptimo.

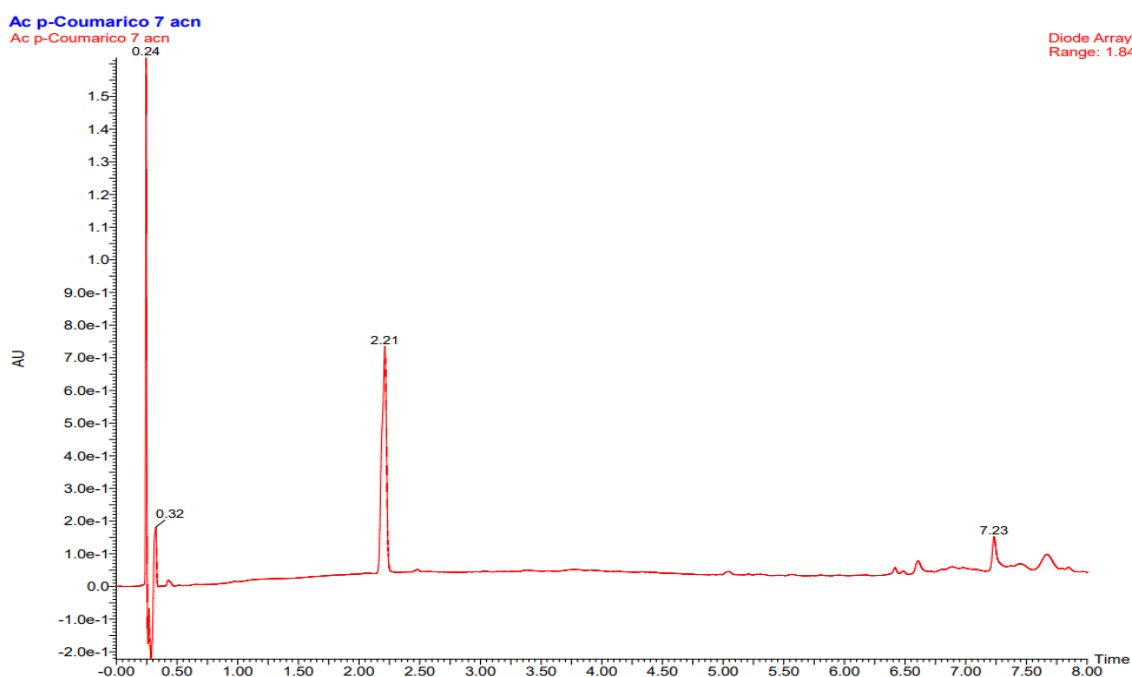


Fig. 4.5 Cromatograma p-coumárico en condiciones de método óptimo.

En los cromatogramas obtenidos que se muestran en la Fig 4.4 y 4.5, se observó una señal y forma de pico adecuada en los cromatogramas individuales y una excelente separación de picos en el cromatograma de la mezcla de la Fig. 4.6. Además, se pudo observar que el pico de mayor concentración llegó a saturar la señal por lo cual se decide disminuir el volumen de inyección a 2 μ L y la concentración de los analitos. Se volvió a realizar el análisis obteniendo un cromatograma que cumple visualmente con los parámetros esperados.

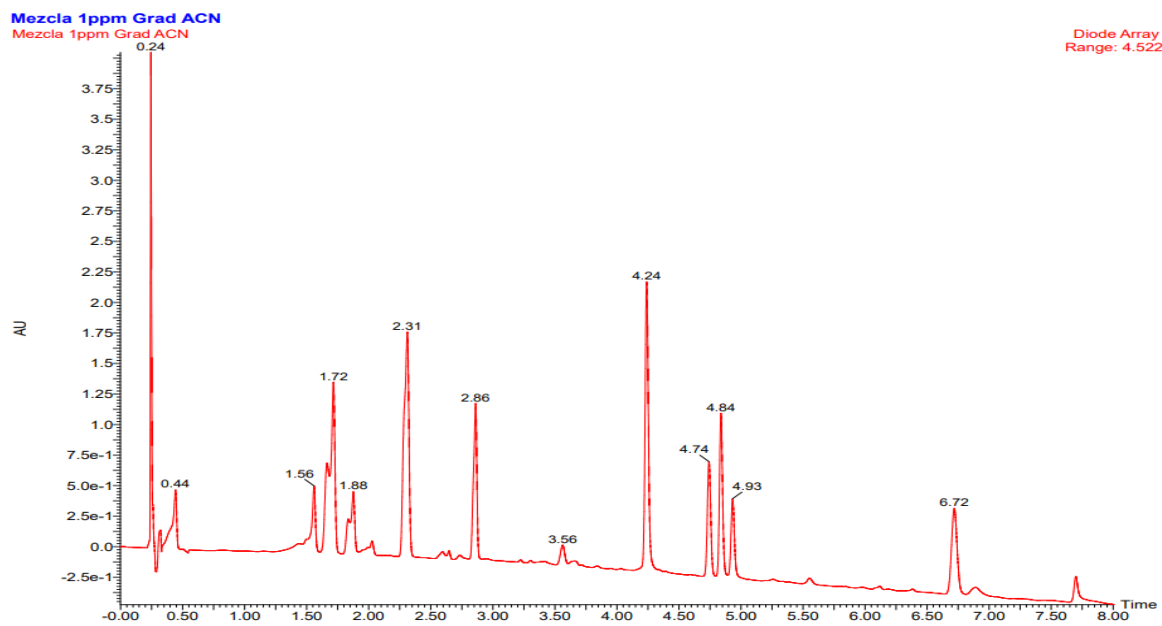


Fig. 4.6 Cromatograma de mezcla en condiciones del método óptimo. Primera corrida.

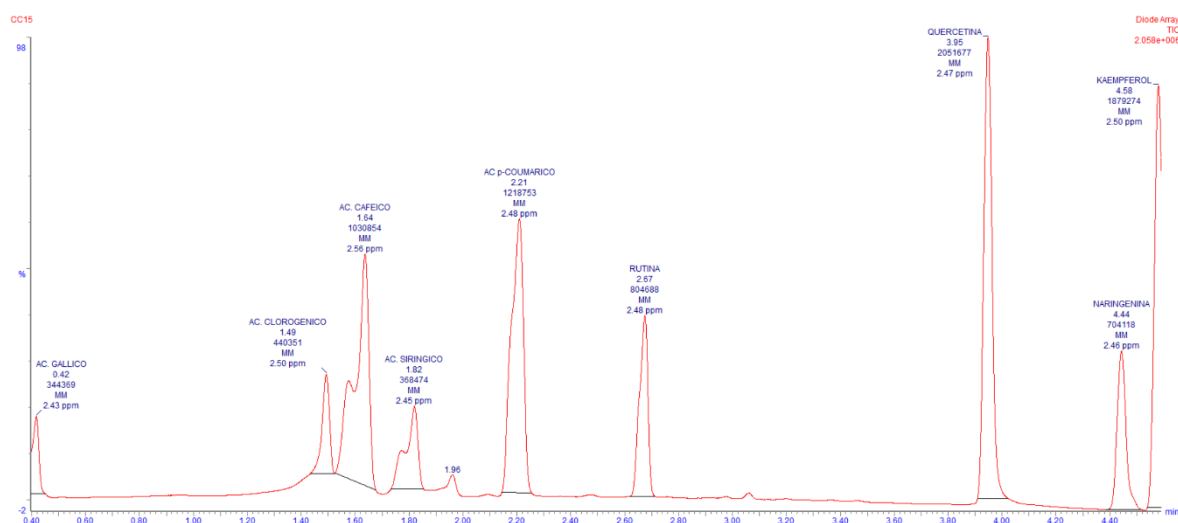


Fig. 4.7 Cromatograma de método óptimo de la mezcla de nueve analitos identificados preparado en metanol a 3 ppm.

En la fig. 4.3 y 4.6 se apreció más de nueve picos de señal dado que la experimentación estaba en una etapa inicial donde se buscó identificar y cuantificar al menos doce compuestos fenólicos, tres de ellos fueron descartados por no contar con los materiales de referencia.

En la fig 4.6 se apreció que los picos en 1.72 y 1.88 presentaron formas características, se contrastaron de manera individual los cromatogramas aislados de cada analito para identificarlos. Las formas características de estos picos se

repitieron en sus cromatogramas individuales, por lo tanto, se comprobó que no existe picos coeluidos o con interferencia.

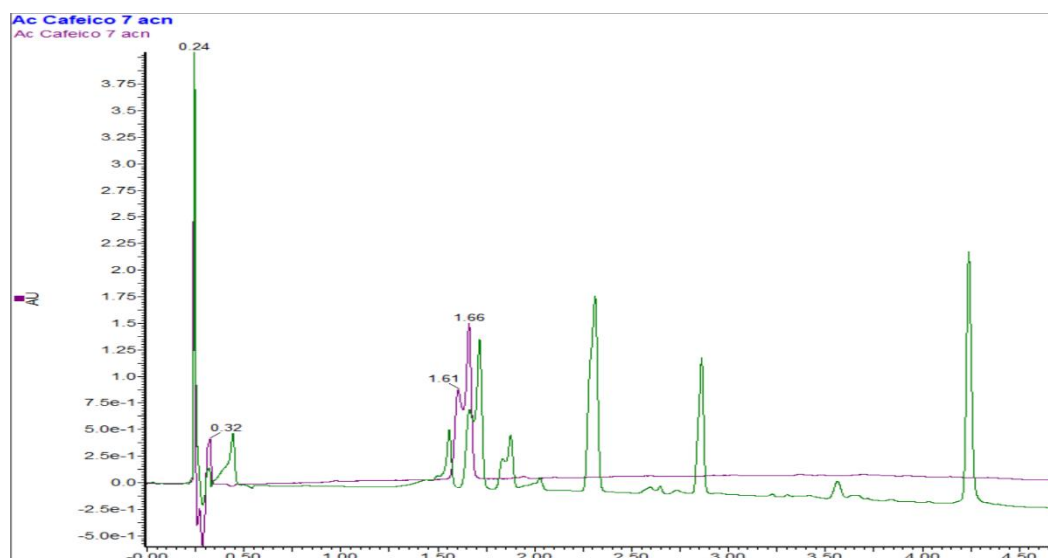


Fig. 4.8 Cromatograma general (verde) contrastado con cromatograma del ac. Cafeico (morado).

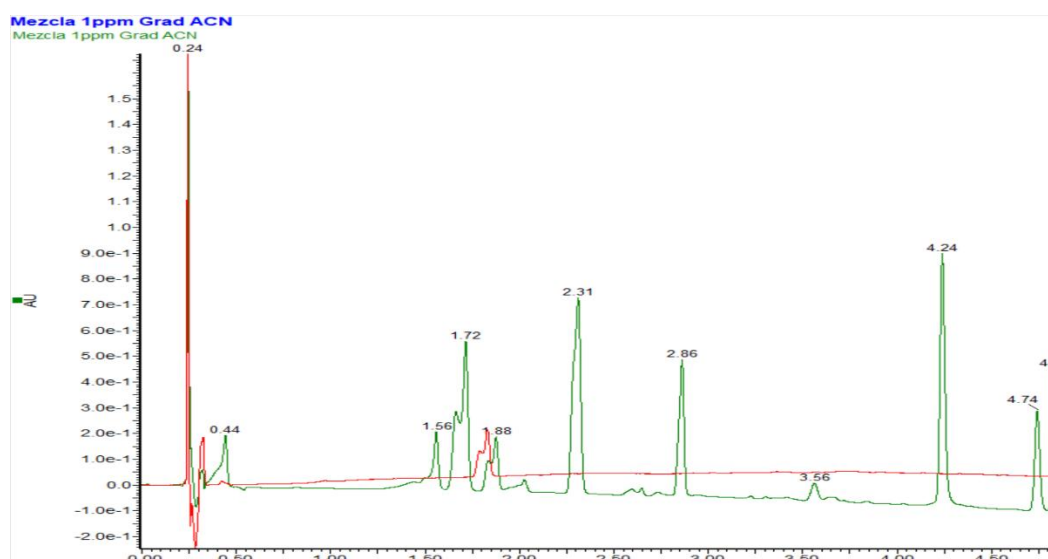


Fig. 4.9 Cromatograma general (verde) contrastado con cromatograma del ac. Siringico.

En la TABLA 4.3 a continuación, se muestra el gradiente utilizado en el método satisfactorio para el análisis de los nueve analitos y en la validación.

TABLA 4.3 GRADIENTE MÉTODO ÓPTIMO

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Ácido fórmico 0,1%	%D Acetonitrilo
--------------	----------------	----------------------	-----------------

0,00	0,5	95,0	5,0
8,0	0,5	40,0	60,0
8,10	0,5	95,0	5,0
10,0	0,5	95,0	5,0

4.2 Pretratamiento de la matriz.

La muestra requirió de una extracción sólido-líquido usando como solvente metanol, empleando el uso de un baño con ultrasonido, el extracto obtenido fue filtrado por gravedad, obteniéndose una solución fluida y clara. Previo a su uso cromatográfico se pasó por un filtro de jeringa de 0,22 μm PVDF. Se seleccionó este tipo de filtro dada su baja extractibilidad, lo que lo hace ideal para aplicaciones donde la pureza del filtrado es crucial.

4.3 Validación del método

Para la validación del método se tomó como referencia la guía de validación ICH Q2R2 y los criterios de aceptación que se describieron en el capítulo 3 [43].

4.3.1 Especificidad

Se evidenció mediante el cromatograma tanto en solvente como en matriz que no existe interferencia entre los nueve analitos de interés ni con impurezas, solventes, o excipientes como se aprecia en las Fig. 4.10.

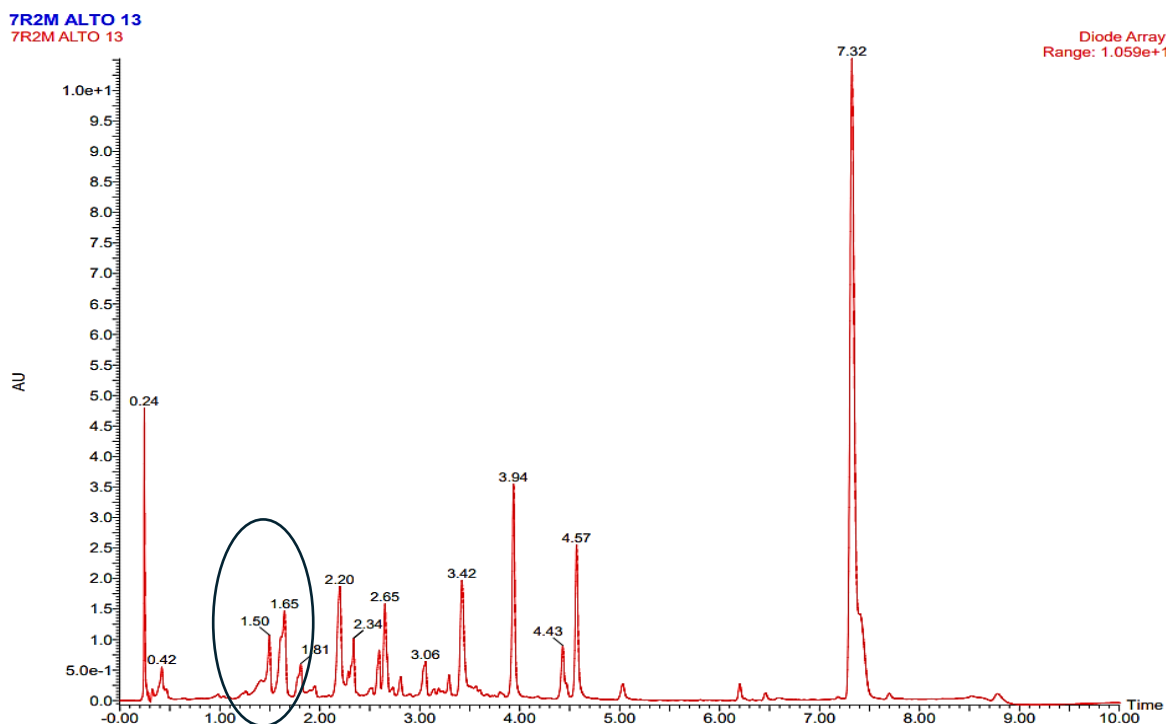


Fig. 4.10 Cromatograma de mezcla en matriz fortificado a 3ppm. Se señala picos más cercanos considerados para la resolución.

Para calcular la resolución se consideró los cromatogramas de la matriz fortificada con la mezcla a 3ppm, en la fig. 4.10 se aprecia que la matriz contiene varios compuestos fenólicos representados por varios picos. Los picos de los analitos que presentan mayor cercanía dado que entre ellos la resolución sería la menor posible dentro del análisis. Se consideró para este cálculo los cromatogramas con la concentración más alta (3 ppm) de los nueve analitos en matriz de tres días distintos, los resultados se muestran en la TABLA 4.4 y se aprecia que para los tres días los picos más cercanos correspondientes a ácido clorogénico y ácido cafeico presentan una resolución mayor a 1, lo que indica que el método es específico.

TABLA 4.4 RESULTADOS RESOLUCIÓN ENTRE PICOS MÁS CERCANOS

Analito	Datos	Día 1	Día 2	Día 3
Ac. Clorogénico	t_1	1,49	1,51	1,51
	W_1	0,09	0,09	0,085
Ac. Cafeico	t_2	1,64	1,65	1,66
	W_2	0,155	0,12	0,12
Resolución	$R_s \geq 1$	1,2245	1,3333	1,4634

Se utilizó el software MASSLYNK, mismo que carece de una herramienta para calcular directamente la resolución cromatográfica.

4.3.2 Linealidad.

La linealidad se estableció en el intervalo completo del procedimiento analítico, en 6 niveles de concentración durante 5 días para los nueve analitos. Los niveles de concentración fueron: 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, 2,5 mg/l y 3 mg/l.

Se determinaron las curvas de regresión para cada analito durante los 5 días de estudio por el método de mínimos cuadrados, las curvas obtenidas se aprecian en los gráficos de la Fig. 4.11 para ácido gálico, Fig. 4.12 para ácido clorogénico, Fig. 4.13 para ácido cafeico, Fig. 4.14 para ácido p-coumárico, Fig. 4.15 para ácido siríngico, Fig. 4.16 para rutina, Fig. 4.17 para quercetina, Fig. 4.18 para naringenina y Fig. 4.19 para kaempferol. De cada gráfica se obtuvo la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación de Pearson los cuales se aprecian resumidos en las tablas 4.5. El estimador de regresión para un nivel de significancia ($\alpha=0.05$) fue el coeficiente de determinación y en todos los casos para los nueve analitos se obtuvieron valores mayores a 0,99. Estos valores señalan el grado en el que la variable dependiente cambia de acuerdo con los cambios de la variable independiente, al ser muy próximos a 1 se confirma que hay linealidad en el rango de trabajo (entre 0,5 mg/l y 3 mg/l).

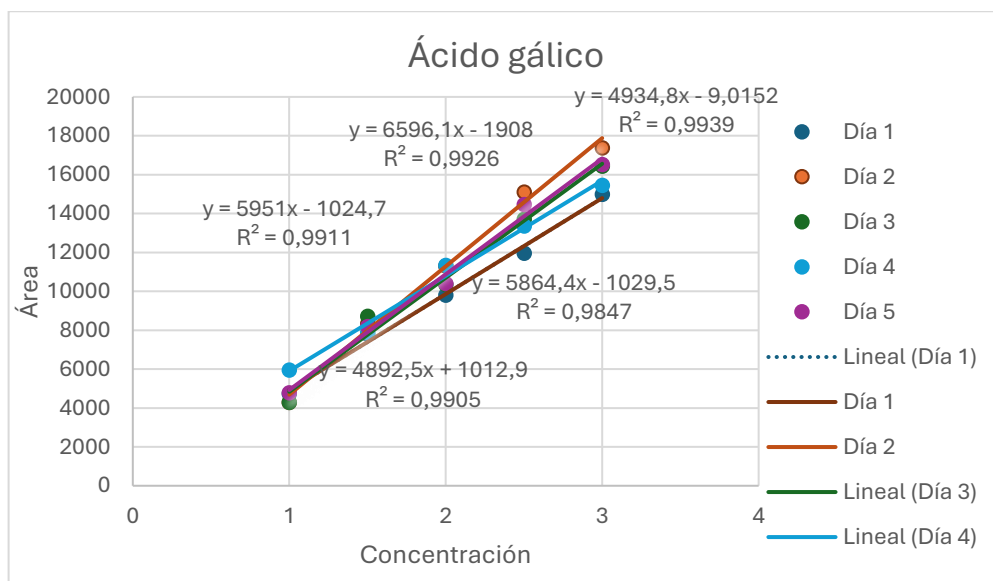


Fig. 4.11 Curvas de regresión lineal para ácido gálico.

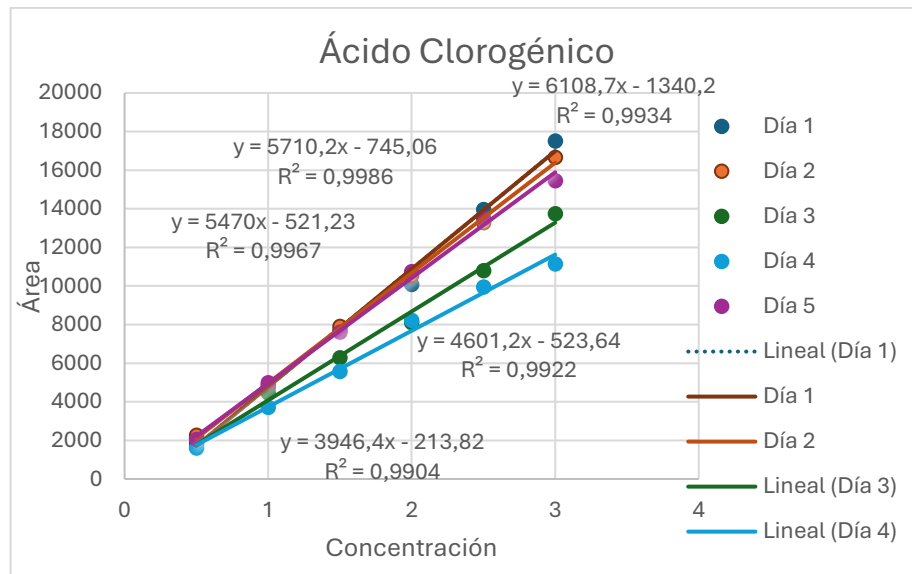


Fig. 4.12 Curvas de regresión lineal para ácido clorogénico.

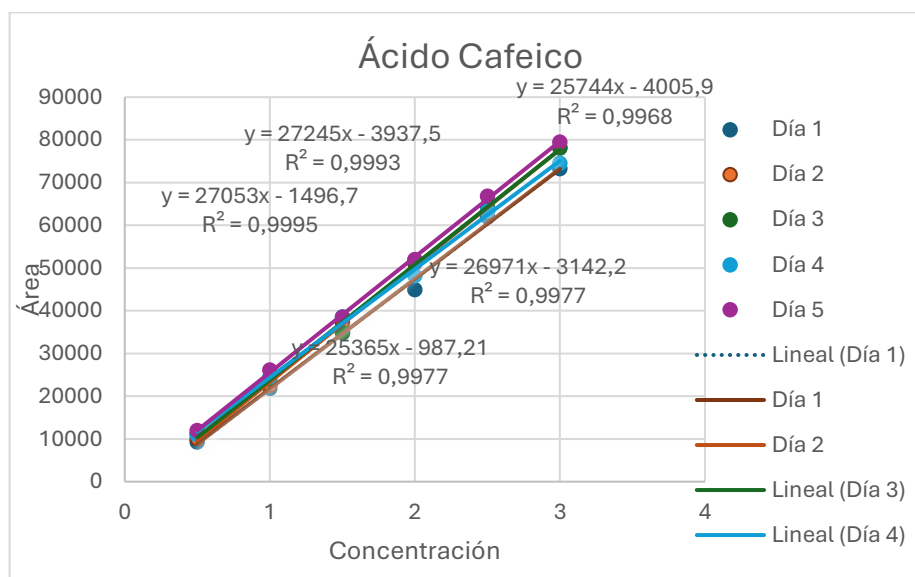


Fig. 4.13 Curvas de regresión lineal para ácido cafeico.

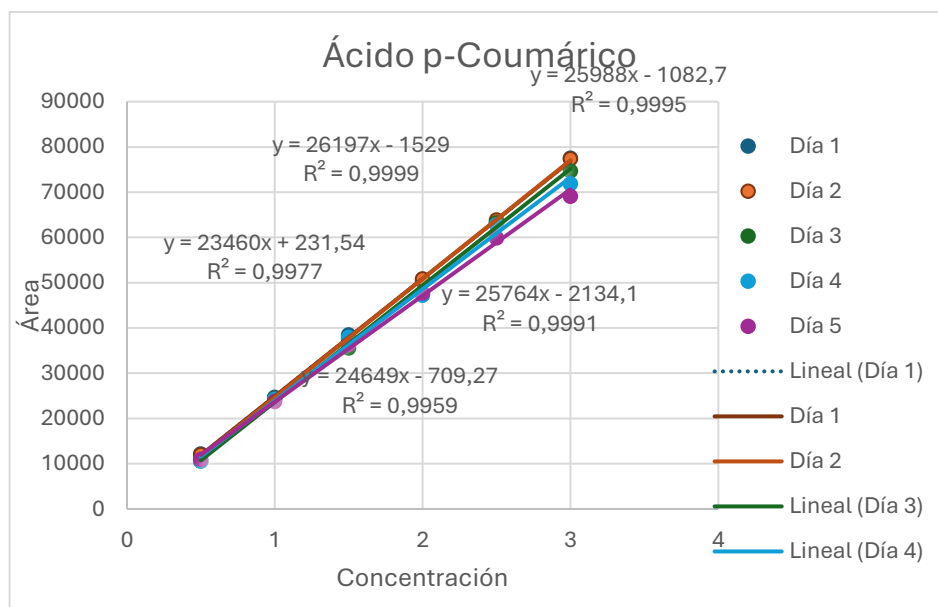


Fig. 4.14 Curvas de regresión lineal para ácido p-coumárico.

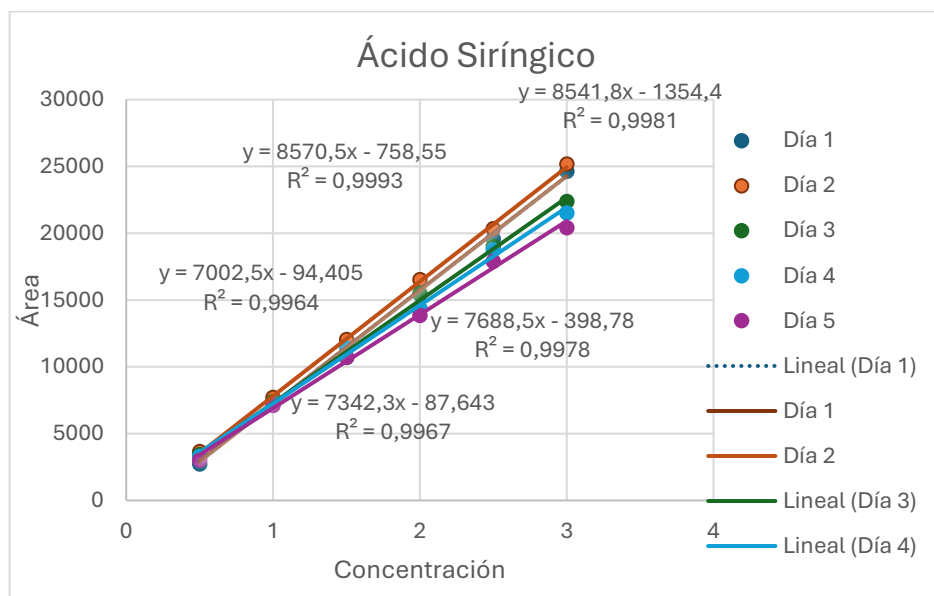


Fig. 4.15 Curvas de regresión lineal para ácido Siríntrico.

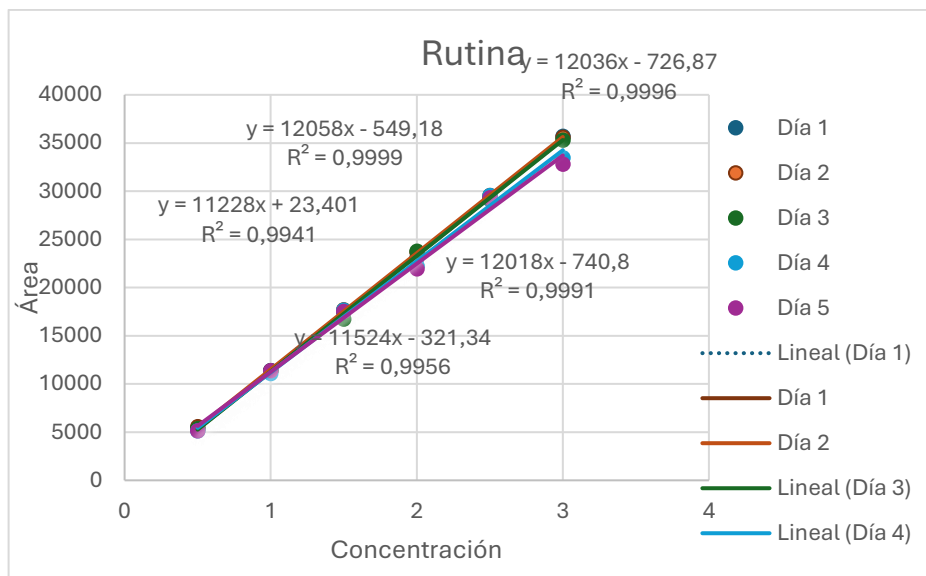


Fig. 4.16 Curvas de regresión lineal para Rutina.

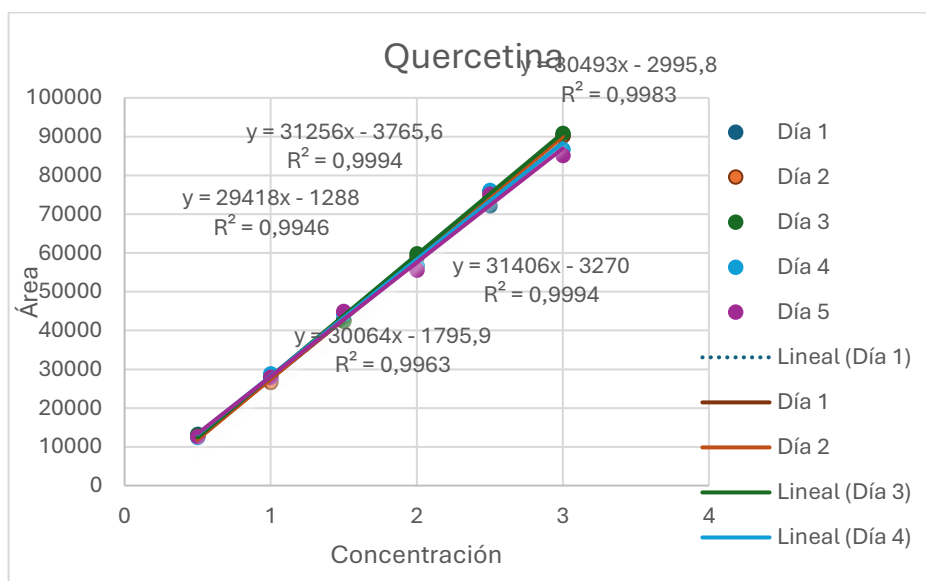


Fig. 4.17 Curvas de regresión lineal para quercetina.

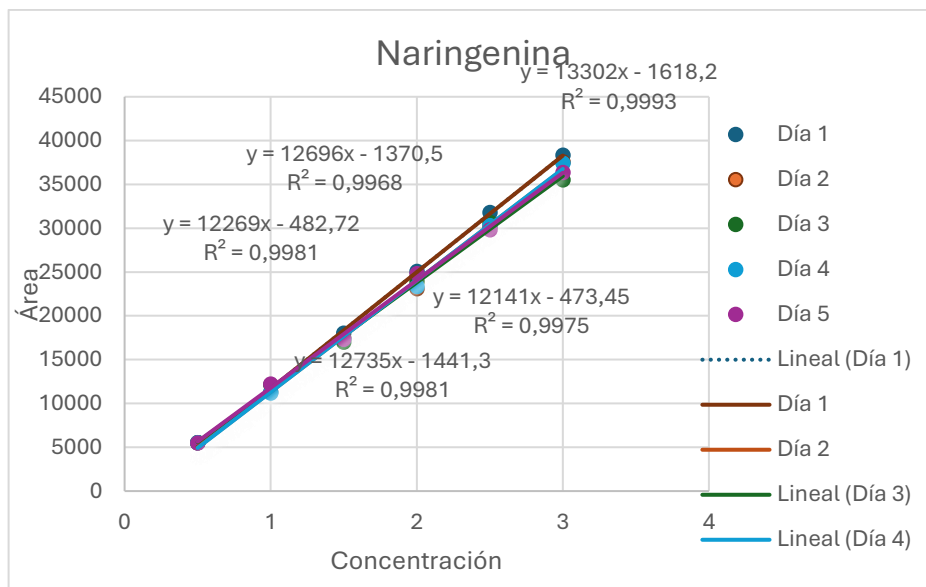


Fig. 4.18 Curvas de regresión lineal para Naringenina.

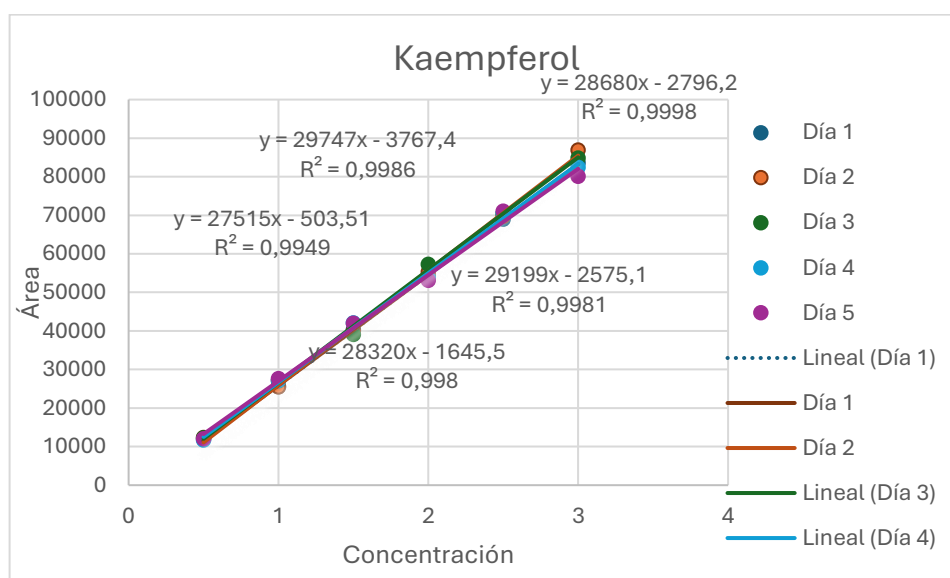


Fig. 4.19 Curvas de regresión lineal para kaempferol.

TABLA 4.5 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO GÁLICO

Ácido Gálico	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	4789,6441	0,9951	804,2067	9,2008E-06	-1,2178
Día 2	6492,4552	0,9953	844,4059		1,3042
Día 3	5289,6060	0,9945	537,7770		0,9746
Día 4	5073,7665	0,9933	589,3440		0,2128
Día 5	5951,0150	0,9911	332,2475		1,3847

TABLA 4.6 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO CLOROGÉNICO

Ácido Clorogénico	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	6108,7041	0,9934	506,1054	2,31191E-05	0,9787
Día 2	5710,2312	0,9922	2855,9779		-1,2423
Día 3	4601,1548	0,9922	506,1054		0,9787
Día 4	3946,3751	0,9904	604,8563		-1,7167
Día 5	5469,9663	0,9967	1190,3881		1,0648

TABLA 4.7 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO CAFEICO

Ácido Cafeico	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	25744,3020	0,9968	1257,1412	3,78E-06	0,1252
Día 2	27244,8438	0,9993	5487,2716		-1,0559
Día 3	26970,9723	0,9977	1755,4418		0,6366
Día 4	25365,2725	0,9977	1755,5367		1,3679
Día 5	27052,9935	0,9995	8325,94962		1,0914

TABLA 4.8 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO P-COUMÁRICO

Ácido P-coumárico	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	25988,0523	0,9995	7953,5568	9,4769E-08	0,3761
Día 2	26197,0362	0,9999	28080,5146		-0,0865
Día 3	25764,1900	0,9991	3330,8757		-1,2252
Día 4	24649,4341	0,9959	967,9936		1,0866
Día 5	23460,2802	0,9977	1740,5167		0,8870

TABLA 4.9 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO SÍRINICO

Ácido Siringico	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	8541,8016	0,9976	2114,9440	1,3372E-06	0,7009
Día 2	8570,4647	0,9992	5904,9440		0,7353
Día 3	7688,5031	0,9972	1779,7950		-1,2801
Día 4	7342,3445	0,9958	1191,2381		1,2323
Día 5	7002,5464	0,9955	1116,7303		0,5177

TABLA 4.10 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO RUTINA

Rutina	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	12036,4748	0,9996	10558,1484	5,379E-08	0,1564
Día 2	12057,8847	0,9999	35312,1595		-1,7152
Día 3	12017,5579	0,9991	4363,6225		0,2392
Día 4	11524,2954	0,9956	903,9810		0,9716
Día 5	11228,3650	0,9941	671,8011		1,4920

TABLA 4.11 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO QUERCETINA

Quercetina	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	30492,7202	0,9983	2321,8415	1,1098E-06	0,8309
Día 2	31255,9149	0,9994	6514,3777		-1,8582
Día 3	31405,5941	0,9932	6805,0150		1,0265
Día 4	30063,8177	0,9954	734,7228		0,3037
Día 5	29418,2681	0,9946	1078,7092		-0,1255

TABLA 4.12 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO NARINGENINA

Naringenina	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	12734,8495	0,9976	2104,3574	1,3506E-06	1,1045
Día 2	13302,1981	0,9991	5665,4542		-1,2462
Día 3	12695,9406	0,9976	2116,9381		1,4761
Día 4	12140,8120	0,9957	929,1423		-1,3259
Día 5	12268,8513	0,9969	1597,5972		0,1466

TABLA 4.13 RESULTADOS DE LINEALIDAD PARA ÁCIDO P-COUMÁRICO

Kaempferol	Pendiente	Coefficiente de determinación R^2	F(Cal)	F(tab)	Residual
Día 1	28679,9413	0,9998	23692,8023	1,0686E-08	1,1714
Día 2	29746,9979	0,9982	2760,7137		-0,8247
Día 3	29199,4621	0,9976	2117,6419		0,2061
Día 4	28319,8376	0,9975	2009,7491		-1,1670
Día 5	27514,5389	0,9936	779,4013		1,5072

Por otro lado, se realizó el análisis de varianza a todas las curvas y están resumidas de la TABLA 4.5 a la TABLA 4.13, con la finalidad de comparar las curvas de calibración. De los resultados obtenidos se concluye que los valores de F calculado para cada uno de los analitos son menores que el F crítico, esto indica que hay evidencia suficiente para concluir que las desviaciones estándar son iguales y que las curvas tienen el mismo valor aleatorio. Se concluyó que las medias de las curvas de calibración de los nueve analitos son estadísticamente iguales, con una probabilidad del 95% de certeza. Además, mediante el análisis de residuales de cada uno de los analitos en los estudios de linealidad, se comparó si las suposiciones del modelo de regresión se cumplen, observándose que no muestran una tendencia visual en la Fig. 4.17, Fig. 4.18, Fig. 4.19, Fig. 4.20, Fig. 4.21, Fig. 4.22, Fig. 4.23, Fig. 4.24 y Fig. 4.25; además se verificó los valores de los residuales

y todos fueron menores a 2, lo que indica que hay una tendencia natural a la linealidad.

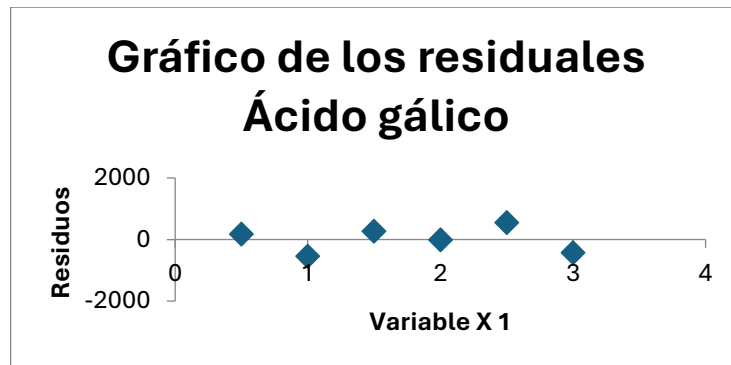


Fig. 4.20 Análisis de residuales de ácido gálico.

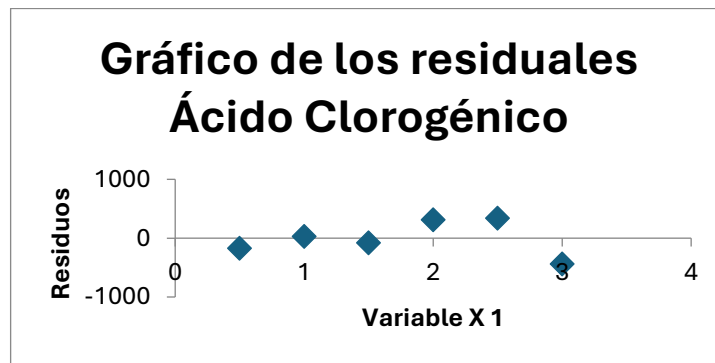


Fig. 4.21 Análisis de residuales de ácido clorogénico.

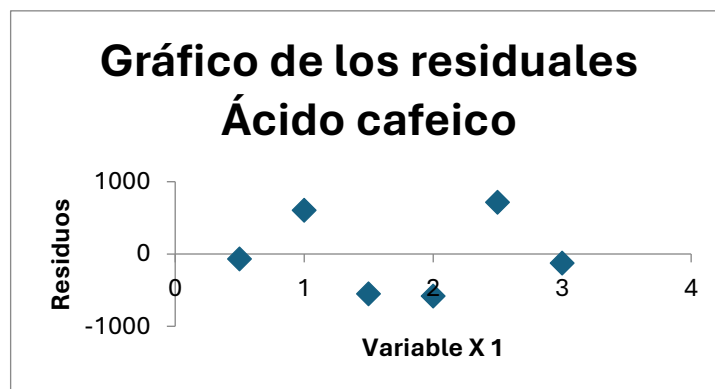


Fig. 4.22 Análisis de residuales de ácido cafeico.

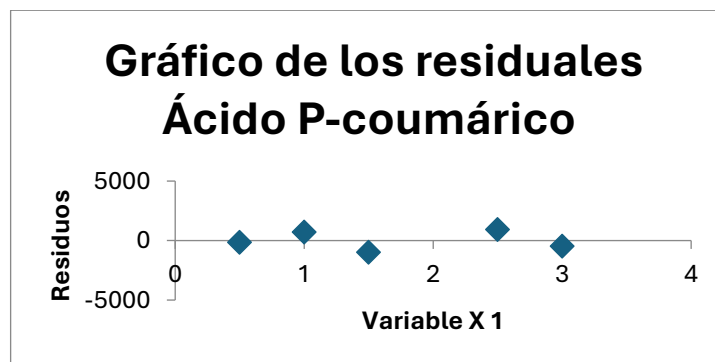


Fig. 4.23 Análisis de residuales de ácido p-coumárico.

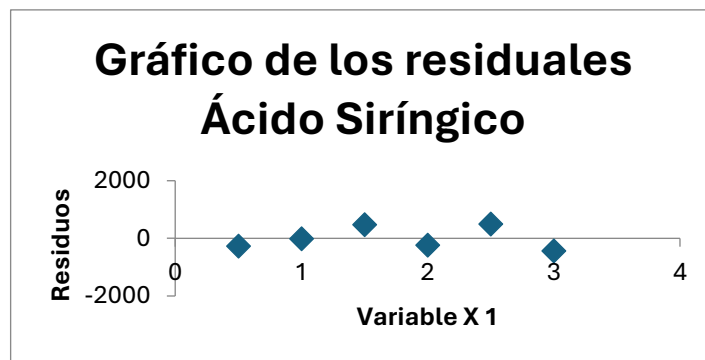


Fig. 4.24 Análisis de residuales de ácido siríngico.

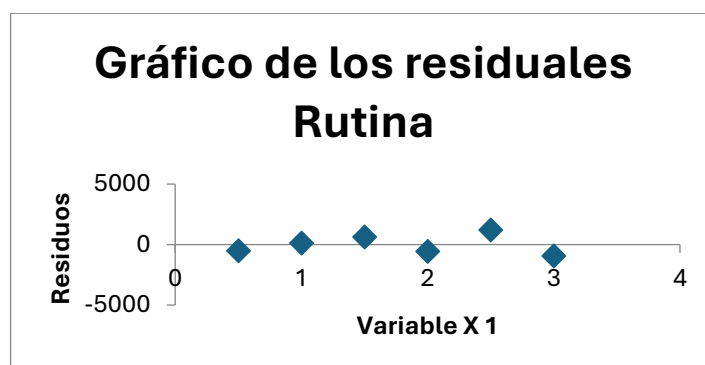


Fig. 4.25 Análisis de residuales de rutina.

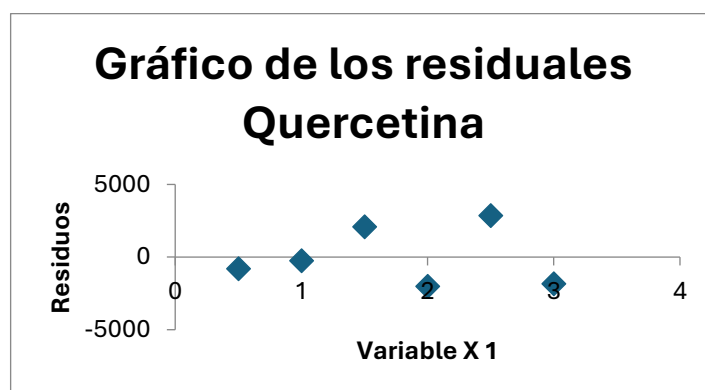


Fig. 4.26 Análisis de residuales de quercetina.

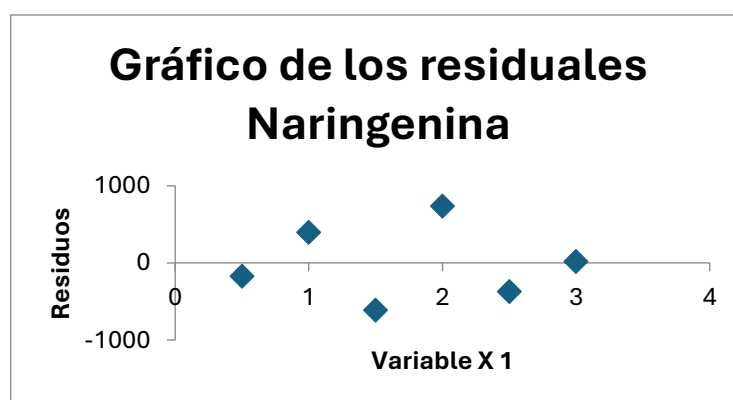


Fig. 4.27 Análisis de residuales de Naringenina.

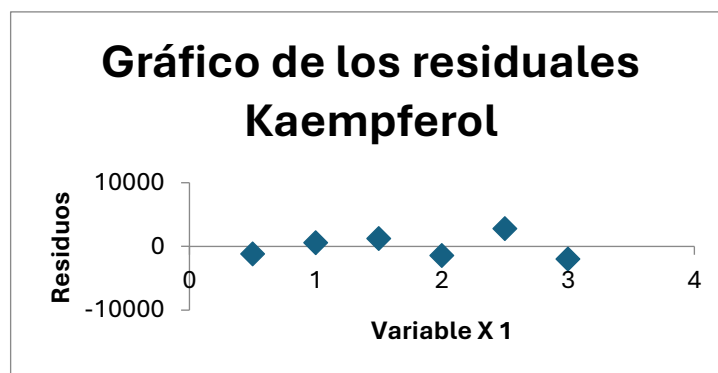


Fig. 4.28 Análisis de residuales de kaempferol.

4.3.3 Efecto matriz

Se evaluó el efecto de una matriz vegetal según lo descrito en la sección 3.2.3.1.1.3. En primer lugar, un análisis cualitativo de los cromatogramas de los nueve analitos en presencia de la matriz demostró que la señal instrumental no se distorsionó, aumentó o disminuyó, al ser comparados con los cromatogramas obtenidos de los nueve analitos en presencia de solvente.

Por otra parte, a partir de los resultados obtenidos se construyeron las respectivas curvas de calibración tanto en solvente como en la matriz durante 3 días diferentes, de las cuales se obtuvo la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación de Pearson respectivo, los resultados se aprecian en las TABLA 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22; presentan valores $R^2 \geq 0,99$ lo que indica que se mantiene la linealidad del método en presencia de la matriz vegetal. Además, un análisis de varianza de las curvas obtenidas tanto en solvente y como matriz revela que el F calculado es $<$ que el F crítico asegurando que no hay diferencias significativas entre la curva de solvente y matriz.

TABLA 4.14 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO GÁLICO

Ácido gálico	Pendiente	Coeficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	5289,6060	0,9945	7,7086	0,1922
	5073,7665	0,9933		
	5951,0150	0,9911		
	3332,9375	0,9905		
Matriz	5810,2733	0,9915		
	5991,2073	0,9940		

TABLA 4.15 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO CLOROGÉNICO

Ácido Clorogénico	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	4601,1548	0,9922	7,7086	0,9703
	3946,3751	0,9904		
	5469,9663	0,9967		
	5269,9324	0,9988		
Matriz	5180,3376	0,9949		
	4909,8817	0,9957		

TABLA 4.16 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO CAFEICO

Ácido Cafeico	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	26970,9723	0,9977	7,7086	0,0031
	25365,2725	0,9977		
	27052,9935	0,9995		
	26178,3042	0,9984		
Matriz	25749,2491	0,9954		
	27593,1107	0,9984		

TABLA 4.17 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA P-COUMÁRICO

Ácido P-coumárico	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	25764,1900	0,9991	7,7086	1,4559E-05
	24649,4341	0,9959		
	23460,2802	0,9977		
	24404,8065	0,9994		
Matriz	25263,8152	0,9986		
	24196,8000	0,9967		

TABLA 4.18 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA ÁCIDO SIRÍNGICO

Ácido Siríngico	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	7688,5031	0,9978	7,7086	0,0692
	7342,3445	0,9967		
	7002,5464	0,9964		
	7305,0432	0,9926		
Matriz	7550,7513	0,9955		
	6972,9682	0,9971		

TABLA 4.19 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA RUTINA

Rutina	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	12017,5579	0,9991	7,7086	0,5511
	11524,2954	0,9956		

Matriz	11228,3650	0,9941		
	11276,8452	0,9975		
	11620,8811	0,9972		
	11303,8747	0,9930		

TABLA 4.20 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA QUERCETINA

Quercetina	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	31405,5941	0,9994	7,7086	1,3040
	30063,8177	0,9963		
	29418,2681	0,9946		
	31265,0763	0,9988		
Matriz	30848,2917	0,9998		
	30836,7172	0,9972		

TABLA 4.21 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA NARINGENINA

Naringenina	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	12695,9406	0,9968	7,7086	1,3040
	12140,8120	0,9975		
	12268,8513	0,9981		
	12402,1850	0,9966		
Matriz	12457,9472	0,9949		
	12184,0967	0,9947		

TABLA 4.22 RESULTADOS EFECTO MATRIZ PARA KAEMPFEROL

Kaempferol	Pendiente	Coefficiente de determinación	F crítico	F calculado
Solvente	28679,9413	0,9998	7,7086	1,3040
	29746,9979	0,9986		
	29199,4621	0,9981		
	30639,4441	0,9985		
Matriz	31440,9030	0,9984		
	29924,0897	0,9972		

Finalmente podemos concluir que al obtenerse valores de F calculados menores que los F críticos, las curvas de calibración con y sin matriz no son significativamente diferentes.

4.3.4 Límite de detección.

El límite de detección se determinó según lo descrito en la sección 3.2.3.1.1.4 los resultados se aprecian en la TABLA 4.23. Para los nueve analitos el límite de detección fue menor al 50% del límite de cuantificación, por lo que la concentración

mínima para todos los analitos puede ser cuantificada con un nivel de confianza aceptable.

TABLA 4.23 RESULTADOS DE LÍMITE DE DETECCIÓN PARA CADA ANALITO

Analito	LOD (mg/l)
Ácido gálico	0,0127
Ácido clorogénico	0,0325
Ácido cafeico	0,0009
Ácido siríngico	0,0021
Ácido p-coumárico	0,0045
Rutina	0,0029
Quercetina	0,0003
Naringenina	0,0029
kaempferol	0,0008

Para los nueve analitos el límite de detección fue inferior al 50% del límite de cuantificación.

4.3.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se determinó según lo descrito en la sección 3.2.3.1.1.5. Los resultados obtenidos se aprecian en la TABLA 4.24, y demuestran que para los nueve analitos se cumple que el límite de cuantificación es menor al 50% del valor medio, por lo que todos los analitos pueden ser medidos con precisión y exactitud aceptable en el rango de concentraciones de la curva de calibración (0,5 mg/l a 3 mg/l).

TABLA 4.24 RESULTADOS DE LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA CADA ANALITO

Analito	LOQ (mg/l)
Ácido gálico	0,0384
Ácido clorogénico	0,0986
Ácido cafeico	0,0028
Ácido siríngico	0,0063
Ácido p-coumárico	0,0137
Rutina	0,0089
Quercetina	0,0008
Naringenina	0,0087
kaempferol	0,0024

4.3.6 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recobro de la cantidad valorada en relación con la cantidad añadida a la muestra, las mismas que de acuerdo a la USP deben estar dentro del 90%-110% [43]. Se evaluó en triplicados a dos niveles de concentración (1,5 mg/l y 3 mg/l) durante 5 días. En la TABLA 4.25, TABLA 4,26 y TABLA 4,27 se resumen los resultados obtenidos.

TABLA 4.25 RESULTADOS DE EXACTITUD PARA ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO CLOROGÉNICO, ÁCIDO CAFEICO

N°	Ácido Gálico		Ácido Clorogénico		Ácido Cafeico	
	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l
1	2,3562	3,5732	3,4226	4,6141	1,7381	3,3434
2	2,3488	3,4781	3,4609	4,7321	1,8173	3,4721
3	2,3019	3,9462	3,4576	4,6965	1,7888	3,5179
4	2,2465	3,7640	3,2932	4,5466	1,7059	3,4438
5	2,2675	3,3401	3,3277	4,8127	1,8602	3,4697
6	2,2465	3,7373	3,2214	4,7171	1,8555	3,4782
7	2,2135	3,8924	3,3731	4,6054	1,7488	3,5547
8	2,0958	4,0588	3,3830	4,6347	1,8235	3,5194
9	2,0745	3,4908	3,6178	5,1050	1,9034	3,5110
10	2,1926	3,5978	3,3309	4,5949	1,7543	3,5156
11	2,0745	3,5074	3,2961	4,9109	1,7882	3,5351
12	2,1253	3,2388	3,2475	4,7824	1,7734	3,4418
13	2,2465	3,9157	3,1695	4,3715	1,8181	3,2934
14	2,2286	3,7892	3,1460	4,2718	1,8626	3,2269
15	2,2465	3,7678	3,0961	4,1385	1,7942	3,3484
Media	2,2177	3,6732	3,3229	4,6356	1,8022	3,4448
St. Desv.	0,0904	0,2359	0,1374	0,2433	0,0540	0,0975
mg/l en matriz	0,8260		1,9184		0,3292	
% Recobro	92,7757	94,9046	93,6333	90,5738	98,1960	103,8515
%RSD	4,0764	6,4215	4,1339	5,2490	2,9967	2,8294

TABLA 4.26 RESULTADOS DE EXACTITUD PARA ÁCIDO SIRÍNICO, ÁCIDO P-COUMÁRICO, RUTINA

N°	Ácido Sirínico		Ácido p-coumárico		Rutina	
	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l
1	1,5234	2,9593	1,6375	3,1423	2,9226	4,2785
2	1,5342	3,0968	1,6722	3,2826	2,9828	4,4653
3	1,5752	3,0539	1,7016	3,2849	2,9808	4,4682
4	1,5166	3,0922	1,6558	3,3249	2,9375	4,4894

5	1,5708	3,0947	1,6809	3,2984	2,9780	4,4279
6	1,5988	3,1238	1,7191	3,3290	2,9597	4,3818
7	1,5004	3,1091	1,6510	3,3949	2,9269	4,5171
8	1,5339	2,9984	1,7021	3,3075	2,9360	4,4222
9	1,5713	3,0432	1,7346	3,3319	2,9962	4,4886
10	1,5688	3,0161	1,6632	3,3551	2,9354	4,5282
11	1,5036	3,0607	1,6945	3,4184	2,9461	4,6738
12	1,4975	3,0180	1,6859	3,3237	2,9125	4,4902
13	1,5588	2,8754	1,4986	2,9303	2,7567	4,0333
14	1,5811	2,8222	1,4829	2,8755	2,7570	3,9708
15	1,5015	2,8171	1,5436	2,9685	2,7324	3,9782
Media	1,5424	3,0121	1,6482	3,2379	2,9107	4,3742
St. Desv.	0,0343	0,1011	0,0777	0,1739	0,0875	0,2140
mg/l en matriz	0,1872		0,2451		1,5175	
% Recobro	90,3444	94,1617	93,5416	99,7587	92,8784	95,2230
%RSD	2,2241	3,3576	4,7142	5,3712	3,0049	4,8919

TABLA 4.27 RESULTADOS DE EXACTITUD PARA QUERCETINA, NARINGENINA, KAEMFEROL

N°	Quercetina		Naringenina		kaempferol	
	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l	Nivel 1 1,5 mg/l	Nivel 2 3 mg/l
1	2,2013	3,7075	1,9438	3,4228	1,5039	3,0949
2	2,2305	3,8415	1,9151	3,4436	1,5381	3,2629
3	2,1854	3,7927	1,8853	3,5272	1,5948	3,2300
4	2,2110	3,8249	1,9625	3,3418	1,5316	3,2623
5	2,2439	3,7960	1,9929	3,3850	1,6009	3,2305
6	2,2171	3,8195	1,9901	3,4368	1,5663	3,2548
7	2,2042	3,8790	1,9552	3,3701	1,5370	3,3005
8	2,2055	3,7705	1,9962	3,3863	1,5019	3,2520
9	2,2758	3,8309	1,9342	3,4751	1,5299	3,2591
10	2,2110	3,9440	1,9918	3,4546	1,5107	3,2183
11	2,2229	3,9968	1,9964	3,9212	1,5506	3,3247
12	2,2112	3,8304	1,8908	3,4172	1,6013	3,1816
13	2,1804	3,5558	1,8723	3,3694	1,4587	2,8666
14	2,1430	3,5161	1,9739	3,3546	1,4645	2,8487
15	2,1659	3,5048	1,9378	3,2145	1,4883	2,8699
Media	2,2073	3,7740	1,9492	3,4347	1,5319	3,1638
St. Desv.	0,0317	0,1457	0,0428	0,1523	0,0456	0,1648
mg/l en matriz	0,7644		0,5774		0,1274	
% Recobro	96,1898	100,3195	91,4536	95,2420	93,6361	101,2141
%RSD	1,4358	3,8597	2,1948	4,4328	2,9753	5,2082

El porcentaje de recobro se calculó relacionando la concentración cuantificada para la fortificada por cien. A la concentración cuantificada se restó un promedio de las concentraciones cuantificadas en tres corridas de la matriz no fortificada dado que la matriz utilizada tiene concentraciones de los analitos.

El porcentaje de recobro reportado para dos niveles de concentración en matriz de cada uno de los nueve analitos están dentro del rango entre 90-110%.

4.3.7 Precisión

La precisión del método se estableció en términos de repetibilidad y el grado de precisión se calculó como la desviación estándar relativa (%RSD) que debe ser menor o igual a 10 ppm según ajuste realizado utilizando la campana de Horwitz [44] para medidas en mg/l. Los resultados de repetibilidad se obtuvieron bajo condiciones del mismo método, concentraciones iguales fortificados a dos niveles, mismos materiales de referencia certificados, en el mismo laboratorio, el mismo analista y equipo. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas del 4.28 al 4.36; en las que se evidencia que el %RSD es menor o igual a 10 en todas las réplicas. Por lo que se puede concluir que el método presenta precisión en los resultados, demostrando que son repetitivos bajo las mismas condiciones experimentales.

TABLA 4.28 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO GÁLICO

Ácido gálico					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,5301	1,4204	1,3875	1,3666	1,4204
	1,5228	1,4414	1,2697	1,2485	1,4025
	1,4759	1,4204	1,2485	1,2992	1,4204
Promedio	1,5096	1,4274	1,3019	1,3048	1,4145
Std. Desv.	0,0294	0,0121	0,0749	0,0592	0,0103
% RSD	1,9492	0,8492	5,7509	4,5391	0,7310
3 mg/l	2,7472	2,9379	3,0663	2,7717	3,0897
	2,6521	2,5141	3,2327	2,6814	2,9631
	3,1202	2,9113	2,6648	2,4128	2,9418
Promedio	2,8398	2,7878	2,9879	2,6220	2,9982
Std. Desv.	0,2474	0,2374	0,2920	0,1867	0,0799
% RSD	8,7116	8,5159	9,7719	7,1206	2,6661

TABLA 4.29.

TABLA 4.29 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO CLOROGÉNICO

Ácido clorogénico					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,5042	1,3748	1,4547	1,4125	1,2512
	1,5425	1,4093	1,4647	1,3777	1,2276
	1,5392	1,3030	1,6994	1,3291	1,1777
Promedio	1,5286	1,3623	1,5396	1,3731	1,2188
Std. Desv.	0,0213	0,0542	0,1385	0,0419	0,0375
% RSD	1,3905	3,9799	8,9973	3,0484	3,0785
3 mg/l	2,6957	2,6282	2,6870	2,6765	2,4531
	2,8137	2,8943	2,7163	2,9925	2,3534
	2,7781	2,7988	3,1866	2,8640	2,2201
Promedio	2,7625	2,7738	2,8633	2,8443	2,3422
Std. Desv.	0,0605	0,1348	0,2804	0,1589	0,1169
% RSD	2,1913	4,8605	9,7913	5,5878	4,9921

TABLA 4.30 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO CAFEICO

Ácido cafeico					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,4089	1,3767	1,4196	1,4250	1,4889
	1,4881	1,5310	1,4943	1,4590	1,5334
	1,4596	1,5263	1,5742	1,4442	1,4649
Promedio	1,4522	1,4780	1,4960	1,4427	1,4957
Std. Desv.	0,0401	0,0878	0,0773	0,0170	0,0347
% RSD	2,7635	5,9394	5,1665	1,1789	2,3212
3 mg/l	3,0142	3,1146	3,2255	3,1864	2,9642
	3,1429	3,1405	3,1902	3,2059	2,8977
	3,1886	3,1490	3,1818	3,1126	3,0191
Promedio	3,1152	3,1347	3,1992	3,1683	2,9603
Std. Desv.	0,0904	0,0179	0,0232	0,0492	0,0608
% RSD	2,9029	0,5719	0,7240	1,5530	2,0542

TABLA 4.31 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO SIRÍNGICO

Ácido Sirínigico					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,3362	1,3294	1,3132	1,3816	1,3715
	1,3470	1,3835	1,3467	1,3164	1,3938
	1,3879	1,4116	1,3841	1,3103	1,3143
Promedio	1,3570	1,3748	1,3480	1,3361	1,3599
Std. Desv.	0,0273	0,0418	0,0354	0,0395	0,0410
% RSD	2,0115	3,0414	2,6296	2,9574	3,0171

3 mg/l	2,7721	2,9050	2,9219	2,8289	2,6882
	2,9096	2,9075	2,8111	2,8735	2,6350
	2,8667	2,9366	2,8560	2,8307	2,6299
Promedio	2,8495	2,9164	2,8630	2,8444	2,6510
Std. Desv.	0,0703	0,0175	0,0557	0,0252	0,0323
% RSD	2,4685	0,6016	1,9457	0,8866	1,2185

TABLA 4.32 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA ÁCIDO P-COUMÁRICO

Ácido p-coumárico					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,3924	1,4107	1,4059	1,4181	1,2535
	1,4271	1,4359	1,4570	1,4494	1,2378
	1,4565	1,4740	1,4895	1,4408	1,2985
Promedio	1,4253	1,4402	1,4508	1,4361	1,2632
Std. Desv.	0,0321	0,0319	0,0421	0,0161	0,0315
% RSD	2,2497	2,2139	2,9052	1,1239	2,4933
3 mg/l	2,8972	3,0798	3,1498	3,1100	2,6852
	3,0375	3,0533	3,0624	3,1733	2,6304
	3,0398	3,0839	3,0868	3,0786	2,7234
Promedio	2,9915	3,0723	3,0997	3,1206	2,6797
Std. Desv.	0,0817	0,0166	0,0451	0,0482	0,0467
% RSD	2,7304	0,5419	1,4557	1,5456	1,7435

TABLA 4.33 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA RUTINA

Rutina					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,4050	1,4200	1,4093	1,4179	1,2392
	1,4653	1,4605	1,4185	1,4286	1,2395
	1,4633	1,4421	1,4787	1,3950	1,2149
Promedio	1,4445	1,4409	1,4355	1,4138	1,2312
Std. Desv.	0,0342	0,0203	0,0377	0,0172	0,0141
% RSD	2,3696	1,4068	2,6240	1,2141	1,1465
3 mg/l	2,7610	2,9719	2,9996	3,0106	2,5157
	2,9477	2,9104	2,9046	3,1562	2,4533
	2,9506	2,8642	2,9711	2,9727	2,4606
Promedio	2,8865	2,9155	2,9584	3,0465	2,4765
Std. Desv.	0,1087	0,0540	0,0487	0,0969	0,0341
% RSD	3,7646	1,8525	1,6469	3,1801	1,3782

TABLA 4.34 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA QUERCETINA

Quercetina					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,4369	1,4465	1,4398	1,4466	1,4160
	1,4661	1,4795	1,4410	1,4585	1,3785

	1,4209	1,4526	1,5114	1,4468	1,4015
Promedio	1,4413	1,4596	1,4641	1,4506	1,3987
Std. Desv.	0,0229	0,0175	0,0410	0,0068	0,0189
% RSD	1,5892	1,2020	2,7978	0,4712	1,3493
3 mg/l	2,9431	3,0604	3,1145	3,1796	2,7913
	3,0770	3,0316	3,0061	3,2324	2,7517
	3,0282	3,0551	3,0665	3,0659	2,7404
Promedio	3,0161	3,0490	3,0624	3,1593	2,7611
Std. Desv.	0,0678	0,0153	0,0544	0,0851	0,0268
% RSD	2,2472	0,5033	1,7750	2,6924	0,9693

TABLA 4.35 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA NARINGENINA

Naringenina					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,3664	1,3851	1,3778	1,4144	1,2948
	1,3377	1,4155	1,4188	1,4190	1,3965
	1,3079	1,4127	1,3568	1,3133	1,3604
Promedio	1,3373	1,4044	1,3844	1,3822	1,3506
Std. Desv.	0,0292	0,0168	0,0316	0,0597	0,0516
% RSD	2,1859	1,1948	2,2802	4,3197	3,8170
3 mg/l	2,8454	2,7644	2,7927	2,8772	2,7920
	2,8661	2,8076	2,8089	3,3438	2,7771
	2,9498	2,8594	2,8977	2,8398	2,6371
Promedio	2,8871	2,8105	2,8331	3,0203	2,7354
Std. Desv.	0,0553	0,0475	0,0565	0,2808	0,0855
% RSD	1,9141	1,6914	1,9950	9,2969	3,1243

TABLA 4.36 RESULTADOS DE PRECISIÓN PARA KAEMPFEROL

Kaempferol					
	Día 1 mg/l	Día 2 mg/l	Día 3 mg/l	Día 4 mg/l	Día 5 mg/l
1,5 mg/l	1,3766	1,4042	1,4096	1,3834	1,3313
	1,4108	1,4736	1,3745	1,4233	1,3372
	1,4674	1,4389	1,4025	1,4740	1,3609
Promedio	1,4183	1,4389	1,3955	1,4269	1,3431
Std. Desv.	0,0459	0,0347	0,0186	0,0454	0,0157
% RSD	3,2360	2,4096	1,3306	3,1823	1,1685
3 mg/l	2,9675	3,1350	3,1732	3,0909	2,7392
	3,1355	3,1031	3,1246	3,1973	2,7213
	3,1026	3,1275	3,1317	3,0543	2,7425
Promedio	3,0686	3,1219	3,1432	3,1142	2,7344
Std. Desv.	0,0890	0,0167	0,0262	0,0743	0,0114
% RSD	2,9014	0,5337	0,8346	2,3864	0,4179

4.4 Evaluación de la Idoneidad del Método Cromatográfico para la Cuantificación de Polifenoles y Flavonoides en Extractos Vegetales.

El método cromatográfico planteado es idóneo para la cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos vegetales ya que cumplió con todos los parámetros de validación establecidos. Permite distinguir y cuantificar los compuestos de interés sin interferencia de otros componentes presentes en la matriz (especificidad), demostró linealidad en el rango de concentración de interés (linealidad), es repetible y reproducible (precisión), su porcentaje de recobro en matriz esta dentro del rango entre 90-110% (exactitud), las curvas de calibración evaluadas en matriz fortificada y solvente no se cruzan en ningún punto (no presentó efecto matriz) y permite definir los límites de cuantificación y detección.

TABLA 4.37 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN QUE DEMUESTRAN IDONEIDAD DEL MÉTODO

Analito	Parámetro de validación	Criterio de aceptación	En Solvente	En Matriz
Ac. Gálico	Linealidad y rango de trabajo	$R^2 \geq 0,99$	0,99505077	0,99048126
		$F(\text{Cal}) > F(\text{tab})$	CUMPLE	CUMPLE
		$\text{RESID} < 2\%$	CUMPLE	CUMPLE
	Límite de detección	LOD	0,01265791	
		LOQ	0,03835732	
	Efecto matriz	Efecto matriz		
		$F(\text{Cal}) < F(\text{tab})$	CUMPLE	
	Especificidad	$\text{RSD} \leq 10\%$	CUMPLE	
		% Recobro (90-110)	CUMPLE	
Ac. Clorogénico	Linealidad y rango de trabajo	$R^2 \geq 0,99$	0,99343031	0,99876523
		$F(\text{Cal}) > F(\text{tab})$	CUMPLE	CUMPLE
		$\text{RESID} < 2\%$	CUMPLE	CUMPLE
	Límite de detección	LOD	0,03254057	
		LOQ	0,09860778	
	Efecto matriz	Efecto matriz		
		$F(\text{Cal}) < F(\text{tab})$	CUMPLE	
	Especificidad	$\text{RSD} \leq 10\%$	CUMPLE	
		% Recobro (90-110)	CUMPLE	
Ac. Caféico	Linealidad y rango de trabajo	$R^2 \geq 0,99$	0,99682827	0,99844314
		$F(\text{Cal}) > F(\text{tab})$	CUMPLE	CUMPLE
		$\text{RESID} < 2\%$	CUMPLE	CUMPLE
	Límite de detección	LOD	0,00091378	
		LOQ	0,00276903	

Ac.P-coumárico	Efecto matriz	Efecto matriz F(Cal)<F(tab)	CUMPLE	
	Especificidad	RSD ≤ 10%	CUMPLE	
	Exactitud	% Recobro (90-110)	CUMPLE	
	Linealidad y rango de trabajo	R2 ≥ 0,99	0,99949733	0,99941276
		F(Cal)>F(tab)	CUMPLE	CUMPLE
		RESID< 2%	CUMPLE	CUMPLE
	Límite de detección	LOD	0,00452223	
	Límite de cuantificación	LOQ	0,01370373	
	Efecto matriz	Efecto matriz F(Cal)<F(tab)	CUMPLE	
	Especificidad	RSD ≤ 10%	CUMPLE	
Ac. Siríngico	Exactitud	% Recobro (90-110)	CUMPLE	
	Linealidad y rango de trabajo	R2 ≥ 0,99	0,99811227	0,99258634
		F(Cal)>F(tab)	CUMPLE	CUMPLE
		RESID< 2%	CUMPLE	CUMPLE
	Límite de detección	LOD	0,00208657	
	Límite de cuantificación	LOQ	0,00632294	
	Efecto matriz	Efecto matriz F(Cal)<F(tab)	CUMPLE	
	Especificidad	RSD ≤ 10%	CUMPLE	
	Exactitud	% Recobro (90-110)	CUMPLE	
	Rutina	Linealidad y rango de trabajo	R2 ≥ 0,99	0,99962129
F(Cal)>F(tab)			CUMPLE	CUMPLE
RESID< 2%			CUMPLE	CUMPLE
Límite de detección		LOD	0,00293393	
Límite de cuantificación		LOQ	0,00889069	
Efecto matriz		Efecto matriz F(Cal)<F(tab)	CUMPLE	
Especificidad		RSD ≤ 10%	CUMPLE	
Exactitud		% Recobro (90-110)	CUMPLE	
Linealidad y rango de trabajo		R2 ≥ 0,99	0,99828019	0,99882368
		F(Cal)>F(tab)	CUMPLE	CUMPLE
	RESID< 2%	CUMPLE	CUMPLE	
Quercetina	Límite de detección	LOD	0,0002729	
	Límite de cuantificación	LOQ	0,00082698	
	Efecto matriz	Efecto matriz F(Cal)<F(tab)	CUMPLE	
	Especificidad	RSD ≤ 10%	CUMPLE	
	Exactitud	% Recobro (90-110)	CUMPLE	
	Linealidad y rango de trabajo	R2 ≥ 0,99	0,99810279	0,99657933
		F(Cal)>F(tab)	CUMPLE	CUMPLE
		RESID< 2%	CUMPLE	CUMPLE
	Límite de detección	LOD	0,00286506	
	Naringenina	Efecto matriz	Efecto matriz F(Cal)<F(tab)	CUMPLE
Especificidad		RSD ≤ 10%	CUMPLE	
Exactitud		% Recobro (90-110)	CUMPLE	
Linealidad y rango de trabajo		R2 ≥ 0,99	0,99810279	0,99657933
		F(Cal)>F(tab)	CUMPLE	CUMPLE
		RESID< 2%	CUMPLE	CUMPLE
Límite de detección		LOD	0,00286506	

Kaempferol	Límite de cuantificación	LOQ	0,008682	
	Efecto matriz	Efecto matriz $F(Cal) < F(tab)$	CUMPLE	
	Especificidad	$RSD \leq 10\%$	CUMPLE	
	Exactitud	% Recobro (90-110)	CUMPLE	
	Linealidad y rango de trabajo	$R^2 \geq 0,99$	0,9998312	0,99850376
		$F(Cal) > F(tab)$	CUMPLE	CUMPLE
		RESID < 2%	CUMPLE	CUMPLE
	Límite de detección	LOD	0,00079011	
	Límite de cuantificación	LOQ	0,00239428	
	Efecto matriz	Efecto matriz $F(Cal) < F(tab)$	CUMPLE	
	Especificidad	$RSD \leq 10\%$	CUMPLE	
	Exactitud	% Recobro (90-110)	CUMPLE	

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. El diseño experimental desarrollado permitió la validación exitosa del método de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD) para la cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos vegetales. La metodología incluyó la optimización de parámetros cromatográficos y la evaluación de especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, cumpliendo con los criterios establecidos por la guía ICH Q2R2. Este diseño experimental demostró ser adecuado para el análisis simultáneo de múltiples analitos en matrices complejas.
2. La evaluación de los parámetros de validación confirmó que el método analítico desarrollado es altamente fiable y preciso. Los resultados mostraron una excelente linealidad con coeficientes de correlación superiores a 0.99 en el rango de trabajo de 0.5 mg/L a 3.0 mg/L. La especificidad del método fue validada, asegurando que no hubo interferencias significativas de la matriz. Los límites de detección y cuantificación fueron adecuados para la cuantificación precisa de los analitos, y los porcentajes de recuperación estuvieron dentro del rango aceptable del 90-110%, indicando una alta exactitud. La precisión del método, evaluada mediante la repetibilidad y reproducibilidad, mostró desviaciones estándar relativas (RSD) menores al 10%, confirmando la consistencia del método.
3. El método validado demostró ser idóneo para la cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos vegetales. La aplicación del método a una matriz real permitió corroborar su efectividad en condiciones prácticas, mostrando que los analitos de interés pueden ser identificados y cuantificados con alta precisión y exactitud. La capacidad del método para manejar variaciones en la matriz vegetal sin comprometer la calidad de los resultados subraya su aplicabilidad en estudios fitoquímicos y su potencial uso en la industria farmacéutica y nutracéutica.

5.2 Recomendaciones

1. Ampliar la capacidad del método para cuantificar un mayor número de analitos añadiendo otros polifenoles y flavonoides.
2. Ajustar el método para reducir el límite de detección y así poder analizar polifenoles y flavonoides en otras matrices de interés comercial como alimentos, bebidas y productos farmacéuticos.
3. Evaluar el parámetro de robustez en matrices vegetales específicas con la finalidad de determinar la capacidad del método para resistir variaciones en las condiciones experimentales e identificar valores críticos que afecten la medición.
4. Determinar la incertidumbre del método para identificar factores críticos que puedan afectar la exactitud del método.
5. Realizar pruebas variando la acidez de la fase móvil acidulada en busca de una mejor resolución en los picos de los polifenoles más cercanos al tiempo muerto.

6 REFERENCIAS

- [1] L. Mizzi, C. Chatzitzika, R. Gatt, and V. Valdramidis, "HPLC Analysis of Phenolic Compounds and Flavonoids with Overlapping Peaks," *Food Technol Biotechnol*, vol. 58, no. 1, p. 12, 2020, doi: 10.17113/FTB.58.01.20.6395.
- [2] J. E. Saquicela Carpio, "Optimización experimental de un método cromatográfico HPLC-DAD para el análisis de polifenoles en frutas," Jul. 16, 2018. Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/30853>
- [3] R. K. Bationo, C. M. Dabiré, A. Hema, R. H. Roger, E. Palé, and M. Nacro, "HPTLC/HPLC-mass spectrometry identification and NMR characterization of major flavonoids of wild lemongrass (*Cymbopogon giganteus*) collected in Burkina Faso," *Heliyon*, vol. 8, no. 8, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10103.
- [4] X. H. Zhang *et al.*, "Aqueous two-phase systems coupled with chemometrics-enhanced HPLC-DAD for simultaneous extraction and determination of flavonoids in honey," *Food Chem X*, vol. 19, p. 100766, Oct. 2023, doi: 10.1016/J.FOCHX.2023.100766.
- [5] I. N. González, M. J. Periago, and F. J. G. Alonso, "Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española," *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, vol. 21, no. 4, pp. 320–326, 2017, doi: 10.14306/RENHYD.21.4.357.
- [6] F. J. Pacheco Coello, D. Ramirez Azuaje, C. Orosco Vargas, I. Pinto Catari, and M. Peraza Marrero, "EFECTO INHIBITORIO DE UN EXTRACTO ACUOSO DE HIBISCUS SABDARIFFA LINN, EN LA OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)," *Biociencias*, ISSN-e 2390-0512, Vol. 15, Nº. 1, 2020 (*Ejemplar dedicado a: Biociencias*), págs. 51-58, vol. 15, no. 1, pp. 51–58, 2020, doi: 10.18041/2390.
- [7] F. Cuesta *et al.*, "Priority areas for biodiversity conservation in mainland Ecuador," *Neotrop Biodivers*, vol. 3, no. 1, pp. 93–106, Jan. 2017, doi: 10.1080/23766808.2017.1295705.
- [8] A. Andreadi *et al.*, "The molecular link between oxidative stress, insulin resistance, and type 2 diabetes: A target for new therapies against

- cardiovascular diseases,” *Curr Opin Pharmacol*, vol. 62, no. Dm, pp. 85–96, 2022, doi: 10.1016/j.coph.2021.11.010.
- [9] S. Briyal, A. K. Ranjan, and A. Gulati, “Oxidative stress: A target to treat Alzheimer’s disease and stroke,” *Neurochem Int*, vol. 165, no. September 2022, p. 105509, 2023, doi: 10.1016/j.neuint.2023.105509.
- [10] H. Sardar *et al.*, “Unveiling the therapeutic and nutritious potential of *Vigna unguiculata* in line with its phytochemistry,” *Heliyon*, vol. 10, no. 18, p. e37911, Sep. 2024, doi: 10.1016/J.HELIYON.2024.E37911.
- [11] C. Liu, S. Gao, J. Ma, Y. Lu, M. Prejanò, and Y. Li, “Real-time monitoring of chromatic and phenolic dynamics of vinification employing UV-Vis spectroscopy, Python and chemometrics,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 132, p. 106359, Aug. 2024, doi: 10.1016/J.JFCA.2024.106359.
- [12] M. Abudawood, H. Tabassum, B. Almaarik, and A. Aljohi, “Interrelationship between oxidative stress, DNA damage and cancer risk in diabetes (Type 2) in Riyadh, KSA,” *Saudi J Biol Sci*, vol. 27, no. 1, pp. 177–183, 2020, doi: 10.1016/j.sjbs.2019.06.015.
- [13] Flores Temoltzi, “Validación de un método por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar Cefotaxima en orina humana,” 2014. Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4978>
- [14] R. N. A. Belhadj, C. Mellinas, A. Jiménez, C. Bordehore, and M. C. Garrigós, “Characterization of invasive aquatic plant *Egeria densa*: A sustainable potential source of bioactive compounds within the circular bio-economy,” *Sustain Chem Pharm*, vol. 44, p. 101922, Apr. 2025, doi: 10.1016/J.SCP.2025.101922.
- [15] M. Ghiasy-Oskoei and M. AghaAlikhani, “Towards utilizing Asteraceae alternative oilseed species on marginal lands: Agronomic performance, fatty acid composition, oil biocompounds, and oil physicochemical properties of Asteraceae species,” *J Agric Food Res*, vol. 14, p. 100799, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.JAFR.2023.100799.
- [16] E. Pérez-Urria Carril and A. Ávalos García, “Metabolismo secundario de plantas,” 2009, *Ana G. Moreno*. Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/20.500.14352/50406>

- [17] “Química común CAS.” Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=149-91-7
- [18] M. Quiñones, M. Miguel, and A. Aleixandre, “Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular,” *Nutr Hosp*, vol. 27, no. 1, pp. 76–89, 2012, doi: 10.3305/nh.2012.27.1.5418.
- [19] M. Halim and A. Halim, “The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes),” Mar. 01, 2019, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.dsx.2019.01.040.
- [20] H. Song, J. Lu, and Q. Chu, “Polyphenols from *Prunus salicina* L. alleviate weight gain, obesity-related hyperlipidemia, hepatic steatosis, hyperglycemia, and modulate gut microbiota in mice fed a high-fat diet,” *Nutrition Research*, vol. 132, pp. 152–163, Dec. 2024, doi: 10.1016/J.NUTRES.2024.11.001.
- [21] L. Ariel Yáñez Yunga and Y. Yunga Luis Ariel, “Compuestos fenólicos en plantas del Ecuador, revisión de propiedades y beneficios medicinales,” 2022, *Quito: UCE*. Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/26414>
- [22] B. Chibuye, I. Sen Singh, L. Chimuka, and K. K. Maseka, “Phytochemical profiling and bioactivity study of *Adenia panduriformis* in Zambia using UHPLC-MS/MS-MZmine3, GNPS, and METLIN Gen2,” *Sci Afr*, vol. 24, p. e02151, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.SCIAF.2024.E02151.
- [23] B. Hemmateenejad, E. Rafatmah, and Z. Shojaeifard, “Microfluidic paper and thread-based separations: Chromatography and electrophoresis,” *J Chromatogr A*, vol. 1704, p. 464117, Aug. 2023, doi: 10.1016/J.CHROMA.2023.464117.
- [24] A. R. Fontana, A. Antoniolli, and R. Bottini, “Development of a high-performance liquid chromatography method based on a core–shell column approach for the rapid determination of multiclass polyphenols in grape pomaces,” *Food Chem*, vol. 192, pp. 1–8, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.06.101.
- [25] B. A. Souto, B. Hai, J. Asomaning, and D. C. Bressler, “Advancing characterization of pyrolysis products: Comprehensive gas chromatography

- methods for analytes in gas and liquid phases,” *J Chromatogr A*, vol. 1741, p. 465641, Jan. 2025, doi: 10.1016/J.CHROMA.2024.465641.
- [26] X. C. Song, E. Canellas, E. Asensio, and C. Nerín, “Predicting the antioxidant capacity and total phenolic content of bearberry leaves by data fusion of UV–Vis spectroscopy and UHPLC/Q-TOF-MS,” *Talanta*, vol. 213, p. 120831, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.TALANTA.2020.120831.
- [27] M. J. Rebelo, R. Rego, M. Ferreira, and M. C. Oliveira, “Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods,” *Food Chem*, vol. 141, no. 1, pp. 566–573, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2013.02.120.
- [28] M. Z. Rad *et al.*, “Competitive Protein-binding assay-based Enzyme-immunoassay Method, Compared to High-pressure Liquid Chromatography, Has a Very Lower Diagnostic Value to Detect Vitamin D Deficiency in 9–12 Years Children,” *Int J Prev Med*, vol. 6, no. JULY, p. 67, Jul. 2015, doi: 10.4103/2008-7802.161069.
- [29] E. Tonhi, K. E. Collins, I. C. S. F. Jardim, and C. H. Collins, “Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados,” *Quim Nova*, vol. 25, no. 4, pp. 616–623, 2002, doi: 10.1590/S0100-40422002000400017.
- [30] G. Flores Temoltzi, “Validación de un método por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar Cefotaxima en orina humana,” 2014. Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4978>
- [31] “Técnicas de laboratorio en bioquímica.” Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available: <https://biomodel.uah.es/tecnicas/#crom>
- [32] A. Kumar Jena, “HPLC: Highly Accessible Instrument in Pharmaceutical Industry for Effective Method Development,” 2012, doi: 10.4172/2153-2435.1000147.
- [33] “CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA”.
- [34] “VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES Q2(R2)”, Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available:

https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf

- [35] Diego A. Ahumada, Cristhian Paredes, Johanna Abella, and Ivonne González, *VALIDACIÓN DE MÉTODOS EN ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO*, 1st ed., vol. 1. Bogotá, 2023. Accessed: Jan. 05, 2025. [Online]. Available: www.inm.gov.co
- [36] A. Faifa López, “Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta presión por la cuantificación de mupiracina 2 unguento en laboratorio Ceguel en el período comprendido de Mayo a Noviembre 2009,” 2010.
- [37] “VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES Q2(R2)”.
- [38] B. Duffau *et al.*, “GUÍA TÉCNICA N ° 1 ‘Se agradece la colaboración prestada por el Sr. Leonardo Merino de la National Food Administration de Suecia, para la elaboración de esta Guía’ • Coordinación Edición”.
- [39] C. Bitwell, S. I. Sen, C. Luke, and M. K. Kakoma, “UHPLC-MS/MS phytochemical screening, polyphenolic content and antioxidant potential of *Diplorhynchus condylocarpon* (Müll.Arg.) Pichon (Apocynaceae), a medicinal plant,” *Sci Afr*, vol. 20, p. e01712, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.SCIAF.2023.E01712.
- [40] J. Kleemann *et al.*, *Priorities of action and research for the protection of biodiversity and ecosystem services in continental Ecuador*, vol. 265, no. 1. Elsevier Ltd, 2022, pp. 93–106. doi: 10.1016/j.biocon.2021.109404.
- [41] C. Liu, S. Gao, J. Ma, Y. Lu, M. Prejanò, and Y. Li, “Real-time monitoring of chromatic and phenolic dynamics of vinification employing UV-Vis spectroscopy, Python and chemometrics,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 132, p. 106359, Aug. 2024, doi: 10.1016/J.JFCA.2024.106359.
- [42] S. Bajkacz, I. Baranowska, B. Buszewski, B. Kowalski, and M. Ligor, “Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials Using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS Method,” *Food Anal Methods*, vol. 11, no. 12, pp. 3563–3575, Dec. 2018, doi: 10.1007/S12161-018-1332-9/FIGURES/6.
- [43] “VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES Q2(R2)”.
- [44] T. P. J. Linsinger and R. D. Josephs, “Limitations of the application of the Horwitz equation,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 25, no. 11, pp. 1125–1130, Dec. 2006, doi: 10.1016/J.TRAC.2006.11.002.

7 APÉNDICES Y ANEXOS

ANEXO 1. Certificados de referencia polifenoles

Certificado de Análisis

Nombre del producto:	Gallic acid monohydrate
Descripción del producto:	ACS reagent, ≥98.0%
Marca de producto:	Sigma-Aldrich
Referencia del producto:	398225
Peso molecular:	188.13
Fórmula molecular:	(HO) ₃ C ₆ H ₂ CO ₂ H · H ₂ O
Número de CAS:	5995-86-8

ENSAYO

Appearance (Color)

Appearance (Form)
Infrared spectrum
Purity (Titration by NaOH)
Residue on ignition (Ash)
Insoluble Matter (C = 3.3%, H₂O)
Sulfate
Meets ACS Tenth Edition
Specification Date:
Date of QC Release:
Print Date:



Barbara Rajzer, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

ESPECIFICACIÓN

Conforms to Requirements
Off-White to Beige
Powder
Conforms to Structure
≥98.0 %
≤0.05 %
≤0.01 %
≤0.02 %
Current ACS Specification

RESULTADOS PARA EL LOTE MKBB3608

Off-White

Powder
Conforms
101.8 %
0.04 %
0.01 %
< 0.02 %
Conforms
MAR 2009
MAY 2009
MAY 08 2009

Certificado de Análisis

Nombre del producto:	Chlorogenic acid
Descripción del producto:	≥95% (titration)
Marca de producto:	Sigma-Aldrich
Referencia del producto:	C3878
Peso molecular:	354.31
Número de CAS:	327-97-9

ENSAYO

Appearance (Color)
Appearance (Form)
Solubility (Color)
Solubility (Turbidity)

Loss on Drying
Titration by NaOH (dry basis)

Specification Date:
Date of QC Release:
Print Date:



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

ESPECIFICACIÓN

White to Off-White
Powder
Yellow
Clear to Hazy
25 mg/mL, EtOH
≤6 %
≥95 %
corrected for Loss on Drying

RESULTADOS PARA EL LOTE 079K0991

Off-White
Powder
Faint Yellow
Clear

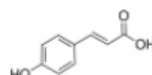
3 %
99 %

JUN 2009
JUL 2009
JUL 21 2009

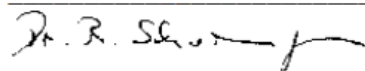
Certificate of Analysis

Product Name:
p-Coumaric acid - $\geq 98.0\%$ (HPLC)

Product Number: C9008
Batch Number: BCCG8417
Brand: SIGMA
CAS Number: 501-98-4
Formula: C₉H₈O₃
Formula Weight: 164.16 AMU
Quality Release Date: 16 NOV 2021



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Yellow and Faint Beige to Beige and Faint Brown to Brown	Off White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Purity (HPLC)	$\geq 98.0\%$	99.9 %
Solubility (Color)	Colorless to Yellow	Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50mg/ml, Ethanol		
¹ H NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms

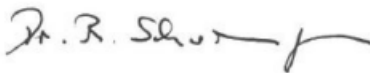


Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland CH

Certificate of Analysis

Product Name: Kaempferol
 $\geq 90\%$ HPLC, powder
Product Number: K0133
Batch Number: BCCD4517
Brand: Sigma
CAS Number: 520-18-3
Formula: $C_{15}H_{10}O_6$
Formula Weight: 286.24
Quality Release Date: 29 JUL 2020

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	LIGHT YELLOW TO YELLOW	YELLOW
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	$\geq 90\%$	99.8 %
SOLUBILITY (COLOR)	YELLOW TO VERY DARK YELLOW	VERY DARK YELLOW
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	20MG/ML IN ETHANOL	20MG/ML IN ETHANOL
WATER	$\leq 10\%$	9.3 %
WAVELENGTH (1) (UV)	266 - 268 NM	267 NM
MOLAR ABSORBANCY INDEX (1)	EMM = 17.0 TO 19.5 (ANHYDROUS BASIS)	EMM = 17.7 (ANHYDROUS BASIS)
SOLVENT (UV)	ETHANOL	ETHANOL
RESIDUAL SOLVENTS (GLC-HS)	$\leq 3\%$	CORRESPONDS

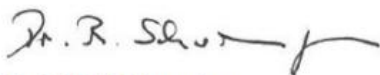


Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

Certificate of Analysis

Product Name: RUTIN HYDRATE
>= 94 % HPLC, powder
Product Number: R5143
Batch Number: BCBW7626
Brand: Sigma
CAS Number: 207671-50-9
Formula: $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot xH_2O$
Formula Weight: 610.52
Quality Release Date: 13 APR 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	YELLOW OR GREEN	YELLOW
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 94 %	95 %
SOLUBILITY (COLOR)	YELLOW TO VERY DARK YELLOW AND BROWN AND YELLOW-BROWN	CONFORMS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	50MG/ML PYRIDINE	50MG/ML PYRIDINE
LOSS ON DRYING	5.5 - 9.0 %	7.4 %
WAVELENGTH (1) (UV)	256 - 258 NM	257 NM
MOLAR ABSORBANCY INDEX (1)	EMM = 21.8 TO 22.8 (DRY BASIS)	EMM = 22.6 (DRY BASIS)
SOLVENT (UV)	METHANOL	METHANOL



Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland



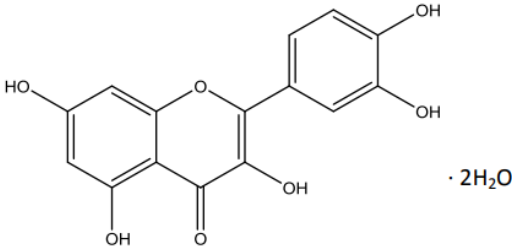
Certificate

QUERCETIN

(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one dihydrate)

USP Catalog No.: 1592409

USP Lot No.: R120F0

	CAS No.: 6151-25-3
	Molecular Formula: $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$
	Molecular Weight: 338.27



LABEL TEXT

For use with specified USP compendial tests. Not for use as a drug. See SDS prior to use at www.usp.org/sds.



Lot: R120F0



REFERENCE STANDARD

QUERCETIN 200 mg

Danger! Toxic if swallowed.

This is the dihydrate form ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$). For quantitative applications, use a value of 0.891 mg of quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$) per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a freezer.

See certificate for any additional information.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
Cat. No. 1592409 Material mfd. in China

Wash thoroughly after handling. If swallowed: Immediately call a poison center/doctor. Rinse mouth. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Jeri L. Joth

Quality Assurance

**Assigned Value**

Please refer to the USP Reference Standard label for the assigned value of the specific lot. If the lot was developed for qualitative use, it will not have an assigned value.

Valid Use Date

It is the responsibility of the user to ascertain that a particular lot of a USP Reference Standard has official status either as a "Current lot" or as a "Previous lot" within the assigned valid use date. The online USP Reference Standards Catalog and the online USP Store at www.usp.org are updated daily. USP recommends referring to one of these sources prior to using a USP Reference Standard to make sure the lot is valid for use.

Storage

Storage conditions are lot-specific and may change from one lot to another. If no specific directions or limitations are provided on the USP Reference Standard label, the conditions of storage shall include storage at room temperature and protection from moisture, light, freezing, and excessive heat.

Instructions for Use

Follow the instructions provided on this Certificate, on the label of the USP Reference Standard, and in the associated USP documentary standard(s). Please refer to General Chapter <11> for additional information.

Non-USP Compendial Use

USP Reference Standards are for use in analytical or laboratory applications as specified in USP compendia. They are not for use in humans or animals as drugs or medical devices. It is the responsibility of the user to determine the suitability of the USP Reference Standard for non-USP compendial uses.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABLE QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

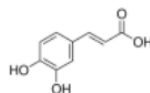
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Caffeic acid - matrix substance for MALDI-MS, ≥99.0% (HPLC)

Product Number: 60018
Batch Number: BCCL6995
Brand: SIAL
CAS Number: 331-39-5
Formula: C₉H₈O₄
Formula Weight: 180.16 g/mol
Quality Release Date: 18 APR 2024
Recommended Retest Date: SEP 2027



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Light Yellow	Faint Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
Titration with NaOH	98.5 - 101.5 %	99.7 %
Purity (HPLC)	≥ 99.0 %	99.1 %
Solubility (Color)	Very Light Yellow to Dark Yellow	Yellow
Solubility (Turbidity) 1g in 10ml Methanol	Clear	Clear
Carbon Content 60.00 % (Theory)		59.78 %
Hydrogen Content 4.48 % (Theory)		4.36 %
¹ H NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Test by UV Spectroscopy	Corresponds to Requirements	Corresponds
Corresponds to Requirements		
Metal Trace Analysis (ICP)	Corresponds to Requirements	Pass
Barium (Ba)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Calcium (Ca)	≤ 20 mg/kg	< 20 mg/kg
Cadmium (Cd)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Cobalt (Co)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Chromium (Cr)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Copper (Cu)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Iron (Fe)	≤ 20 mg/kg	< 20 mg/kg
Potassium (K)	≤ 50 mg/kg	< 50 mg/kg

Supelco®

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Number: 60018
Batch Number: BCCL6995

Test	Specification	Result
Magnesium (Mg)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Manganese (Mn)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Sodium (Na)	≤ 50 mg/kg	< 50 mg/kg
Nickel (Ni)	≤ 20 mg/kg	< 20 mg/kg
Lead (Pb)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg
Zinc (Zn)	≤ 5 mg/kg	< 5 mg/kg

Dr. R. Schwenninger

Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland CH

Certificado de Análisis

Nombre del producto:	Naringenin
Descripción del producto:	natural (US), 98%
Marca de producto:	Sigma-Aldrich
Referencia del producto:	W530098
Peso molecular:	272.25
Número de CAS:	67604-48-2

ENSAYO

Appearance (Color)
Appearance (Form)
Melting Point
Proton NMR spectra
Purity (HPLC)
Optical Rotation
Arsenic (As)
Cadmium (Cd)
Mercury (Hg)
Lead (Pb)

Specification Date:

Date of QC Release:

Print Date:



Barbara Rajzer, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

ESPECIFICACIÓN

White to Brown
Powder
247 - 254 °C
Conforms to Structure
≥ 97.5 %
deg
≤ 3.0 ppm
≤ 1.0 ppm
≤ 1.0 ppm
≤ 1.0 ppm

RESULTADOS PARA EL LOTE MKAA2821

Light Brown
Powder
252 °C
Conforms
98.1 %
0.3 deg
< 1.0 ppm
< 1.0 ppm
< 1.0 ppm
< 1.0 ppm
MAR 2009
MAR 2009
MAR 13 2009