

VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR MEDIO DE UHPLC PARA LA
DETERMINACIÓN DE PUNGENCIA DE PASTA DE AJÍ.

JONATHAN HAIR GUAUQUE MEDINA

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2017

VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR MEDIO DE UHPLC PARA LA
DETERMINACIÓN DE PUNGENCIA DE PASTA DE AJÍ.

JONATHAN HAIR GUAUQUE MEDINA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA

TUTOR: GUILLERMO LEON MONTOYA, PhD

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2017

CONTENIDO

ii. RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	7
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	7
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	9
2.3 OBJETIVOS.....	15
2.3.1 OBJETIVO GENERAL	15
2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA.....	16
2.4.1 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO	16
2.4.2 MÉTODO ANALÍTICO.....	16
CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES.....	16
2.4.3 MATRIZ DE MARCO LÓGICO.....	17
3. RESULTADOS	19
3.1 SELECTIVIDAD.....	19
3.2 LINEALIDAD.....	20
3.3 PRECISIÓN.....	22
3.3.1 REPETIBILIDAD	22
3.3.2 PRECISIÓN INTERMEDIA	25
3.4 EXACTITUD	27
3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	28
4. DISCUSIÓN	30
5. CONCLUSIONES	39
6. RECOMENDACIONES	40
7. REFERENCIAS.....	41
8. ANEXOS	44

ii. RESUMEN

Actualmente, en Colombia el sector hortofrutícola del ají se encuentra en crecimiento en términos de producción, desarrollo y exportación. El departamento del Valle del Cauca cuenta con características de suelo y condiciones, tanto ambientales como agrológicas, favorables para este cultivo. Empresas privadas han venido haciendo un aprovechamiento de estas ventajas, lo que les permite alta competitividad nacional e internacional, llegando incluso a tener producciones cercanas a las 25 toneladas de ají por hectárea. Los frutos y oleorresinas derivadas del ají poseen una característica conocida como pungencia, la cual produce una sensación de “picor-ardor” generada estrictamente por los capsaicinoides -mayoritariamente la capsaicina y la dihidrocapsaicina-, y los cuales son empelados como un criterio de calidad en esta agroindustria. En consecuencia, se ha identificado un déficit a nivel nacional con respecto al servicio de la medición del grado de pungencia, pues no existe un centro de investigación regional o local calificado para realizar este tipo de valoración analítica.

Corolario de lo anterior, el objetivo de este proyecto fue validar una metodología analítica desarrollada a través de cromatografía líquida (UHPLC), que sirviera de apoyo al Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ) de la Universidad Icesi, para evidenciar la idoneidad del servicio de valoración y determinación del grado de pungencia en términos Scoville Heat Units (SHU) de muestras comerciales de oleorresinas que contienen capsaicinoides. Para llevar a cabo el proyecto, fue necesario realizar un protocolo de validación que estableció de manera detallada el paso a paso de pruebas que se realizaron, y al mismo tiempo establecer los criterios de aceptación. Se procedió a realizar dichas pruebas expuestas en el protocolo, validando y cumpliendo con cada criterio de aprobación en cada parámetro, y por último se llevó a cabo un Procedimiento Operativo Estándar (POE). El resultado arrojó la validación de la nueva metodología analítica la cual cumplió con los parámetros que expone la norma oficial internacional ICH Q2 R1, derivando en una nueva herramienta analítica que servirá en la región para demostrar el nivel de calidad de los productos derivados del ají y contribuyendo a caracterizar las propiedades pungentes de las oleorresinas de diferentes variedades de *Capsicum* con rasgos potencialmente comerciales. Estas descripciones cuali-cuantitativos pueden utilizarse para aportar, en participación con agricultores y empresarios locales, material para el desarrollo de productos de alto valor y seguir aportando en la especialización del mercado.

Palabras Clave: *Pungencia, Capsaicinoides, Validación, Método y Parámetros.*

1. INTRODUCCIÓN

El ají, perteneciente al género *Capsicum*, surgió en los territorios áridos y altos de los Andes suramericanos; por su característico sabor y aroma, hoy en día es importante en la dieta alimenticia para diferentes culturas. Estos frutos son una fuente relevante de vitaminas C y E y provitamina A, así como de otros antioxidantes que contrarrestan la oxidación de lípidos a través de radicales libres, razón por la cual se discute su funcionalidad como protección contra el cáncer, anemia, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Bosland & Votava, 2012). El ají se consume directamente como verdura fresca o como condimento y se utiliza en la industria farmacéutica como medicamento, colorante y otros usos potenciales que se derivan de la capsaicina y oleorresinas (Meckelmann, y otros, 2013). Los compuestos responsables de la pungencia son conocidos como capsaicinoides (Fig. 1), los cuales han sido empleados en diferentes tipos de productos en la industria nacional e internacional, tales como cremas para aliviar el dolor local, y en forma de pulverizadores para evitar posibles plagas en diferentes cultivos (Betts, 2008).

En el presente proyecto se validó una nueva metodología analítica por medio de UHPLC para la valoración de capsaicinoides, desarrollada y estandarizada en el semillero de productos naturales de la universidad Icesi. Dicho método está destinado a determinar el grado de pungencia en términos de SHU en oleorresinas y algunos frutos secos de ají (Tabasco (*C. frutescens*), Cayena (*C. annum*) y Habanero (*C. chinense*)). Previamente al desarrollo de este proyecto, existía un método oficial (AOAC Official Method 995.03, 1995) para la valoración de la pungencia en matrices derivadas de los frutos de ají. Dicho método, en comparación al método propuesto y validado por el presente estudio, exige el uso de altos volúmenes de solventes, mayor tiempo de análisis, por lo tanto es un método menos selectivo, más contaminante ambientalmente y más costoso. Adicionalmente, en el entorno nacional no existe un centro de prestación de servicios analíticos acreditado por el Consejo Nacional de Acreditación (CNA) que brinde un método para la cuantificación de capsaicinoides.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El sector hortofrutícola del ají en Colombia se encuentra en una posición muy interesante de desarrollo, ya que cuenta con requisitos agrológicos y ambientales que permiten generar las condiciones óptimas para obtener cosechas a lo largo de todo el año. El área cosechada de Ají en el año 2011 fue de 2.045 hectáreas, sectorizada en los departamentos de Magdalena y Bolívar, Valle del Cauca, La Guajira y Córdoba(Programa de Transformación Productiva (PTP), 2013). Los pimentones y ajíes son de suma importancia económica para el país; recientemente, las exportaciones han ido en alza, pues en 2011 se registraron 2.030 toneladas (US\$3.191 millones), en el 2012 fueron 1.766 toneladas (US\$3.573 millones) y en el 2013 se llegó a un valor de 2.781 toneladas (US\$5.630 millones) que salieron del territorio nacional hacia diferentes partes del mundo (Minagricultura, 2014). A la vez, según algunas proyecciones, en el 2020 el país deberá tener un volumen de producción en fresco por más de veintinueve mil toneladas, y para el 2030 se ubicará dentro de los ocho primeros exportadores a nivel mundial (Programa de Transformación Productiva (PTP), 2013).

Dentro del territorio nacional se cultivan diferentes especies de ají, entre ellas las que son semillas foráneas más comercializadas como el tabasco, la cayena y el habanero, los cuales suelen ser los componentes principales de la pasta de ají (Martínez, 2008). En el ají se encuentran diferentes moléculas bioactivas, como lo son los capsaicinoides; los cuales le proveen el valor de pungencia a los frutos de *Capsicum*. Principalmente los tipos más representativos en el ají son la capsaicina y dihidrocapsaicina, que representan alrededor del 77 al 98% del contenido total de capsaicinoides (Barbero, et al., 2014). Según los estándares de calidad de la industria del ají, la pungencia expresada en términos de SHU es un parámetro de suma importancia a la hora de evaluar la aceptación de sus productos derivados en el mercado. Corolario a lo expuesto anteriormente, es menester indagar sobre un nuevo método estandarizado y eficaz para la cuantificación de capsaicinoides, que cumpla con los propósitos de medir y reportar pungencias reales, precisas y exactas; de esta manera, la pregunta de investigación que guiará el presente trabajo toma como objeto central formular una propuesta innovadora y alternativa al método AOAC y que incluya su validación.

La pertinencia del presente proyecto esta direccionada a generar informes que evidencien los valores de pungencia que se están reportando en la región por parte del Semillero de Productos Naturales de la Universidad Icesi, y de esta manera darle valor agregado a los aportes nutricionales y alimenticios que poseen nuestros productos nacionales tipo exportación. El presente proyecto se inscribe en un orden investigativo, mas sus repercusiones y resultados se pueden extrapolar a esferas industriales, agropecuarias y farmacéuticas. Por tanto, su

alcance no se limita sólo a validar una metodología adaptada a los parámetros analíticos internacionales, sino también a futuras investigaciones científicas de tipo biofarmacéutico y/o biotecnológico; a la vez, poder consolidarse como una herramienta que de un gran valor agregado al sector hortofrutícola del ají en la región, pues en los últimos años la exportación de pasta de ají ha dado excelentes resultados tanto de calidad como de productividad.

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Cultivo de ají actualmente en Colombia.

Pertenece a la familia *Solanaceae* junto con otras plantas como el tomate, la papa o el tabaco, las plantas del género *Capsicum* son algunas de las plantas cultivadas más antiguas. Durante más de 6000 años, los frutos del ají, han sido utilizados para muchos propósitos y no sólo como especias o alimentos en la dieta humana.(Perry, y otros, 2007) De los análisis moleculares se concluye que el género *Capsicum* se originó probablemente en regiones áridas de la cordillera de los Andes, en lo que se convirtió en Perú y Bolivia, y luego migraron a las regiones de las tierras bajas tropicales de las Américas(Walsh & Hoot, 2001.).Colombia presenta una actividad agrícola promisoriosa en el sector hortofrutícola, como lo es el cultivo de ají, el cual presenta inmejorables condiciones para ser tenido en cuenta tanto por agricultores como exportadores nacionales. Desde el punto de vista de producción, el ají tiene un valor y tasa de crecimiento superior al promedio de los demás cultivos. El género *Capsicum*, que incluye aproximadamente 30 especies, de las cuales tres, (*C. frutescens*, *C. annum* y *C. chinense*) son de las más cultivadas en nuestro territorio nacional(Martínez, 2008). De las anteriores especies se han reportado características fitoquímicas y datos nutricionales (Tabla 1) que hacen de estas tres un foco atractivo de producción.

Tabla 1. Composición de 100 gramos en diferentes especies de ají, (*C. frutescens*, *C. annum* y *C. chinense*)(Martínez, 2008.):

Componentes	Unidad	Valores
Agua	g	85,0 - 89,0
Valor Energético	Cal	40 – 60
Proteína	g	0,9 - 2,5
Grasa	g	0,7 - 0,8
Carbohidratos	g	8,8 - 12,4
Fibra	g	2,4 - 2,9
Calcio	mg	21,0 - 31,0
Fósforo	mg	21,0 - 58,0
Hierro	mg	0,9 - 1,3
Caroteno	mg	2,5 - 2,9
Riboflavina	mg	0,11 - 0,58
Niacina	mg	1,25 - 1,47
Ácido ascórbico	mg	48,0 - 60,0

De acuerdo a las condiciones agroecológicas y la variedad, en la mayoría de cultivos nacionales la cosecha se realiza de los 80 a 100 días después del trasplante, se hace de forma manual y posteriormente se recomienda ser transportada y almacenada de 7 a 10 °C con una humedad relativa de 95%, pues son susceptibles a daños en temperaturas inferiores a 7°C (Sembramos, 2013). Cuando se utiliza para el procesamiento el fruto debe haber alcanzado su máxima

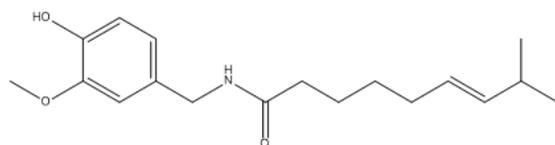
maduración en la planta, para lograr una mayor concentración de capsaicinoides, los cuales son los responsables de otorgarle el valor de pungencia a tales frutos.

Para basarse en el precio y la calidad del Ají, el comercio internacional se sustenta principalmente en los siguientes atributos (Meckelmann, y otros, 2013):

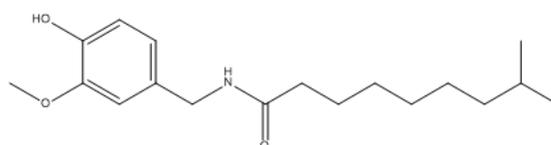
- ✓ Color extraíble, grado de calidad que es dictado por el método 20.1.10 de la American Spice Trade Association (ASTA).
- ✓ Color superficial (CIE L*, a*, b* y Hue Angle).
- ✓ Pungencia por capsaicinoides totales, reportado en unidades SHU.
- ✓ Patrón específico de capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina).
- ✓ Contenido total de polifenoles, utilizando el ensayo de Folin-Ciocalteu.
- ✓ Capacidad antioxidante (TEAC).
- ✓ Flavonoides totales y específicos (quercetina, kaempferol, Luteolina y apigenina).
- ✓ Contenido de grasa como indicador de la vitamina E, la vitamina C (ácido ascórbico + dehidroascórbico),

Capsaicinoides.

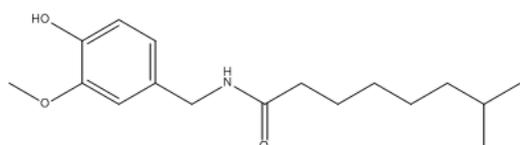
Este grupo químico se caracteriza por estar naturalmente presente en pimientos picantes del género *Capsicum* y oleorresinas derivadas de estos frutos. Son ácidos grasos derivados de un grupo análogo químico de tipo N-vainillilamida, y se caracterizan por poseer una característica de picor-ardor, conocida como pungencia (Gonzalez-Zamora, et al., 2013). Principalmente la capsaicina y la dihidrocapsaicina representan alrededor del 77-98% del contenido total de capsaicinoides en los frutos de ají, y en menor concentración se encuentran otros, tales como la nordihidrocapsaicina, norcapsaicina, homocapsaicina, homodihidrocapsaicina, nornorcapsaicina, nornornorcapsaicina, y nonivamida (Barbero, et al., 2014).



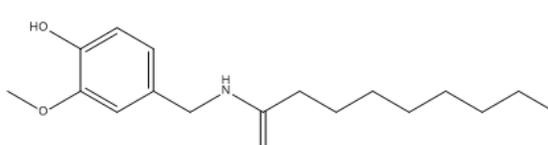
(E)-N-[(4-hidroxy-3-metoxifenil)metil]-8-metilnon-6-enamida
Capsaicina



N-(4-hidroxy-3-metoxibencil)-8-metilnonanamida
Dihidrocapsaicina



N-(4-hidroxy-3-metoxibencil)-7-metiloctanamida
Norhidrocapsaicina



N-[(4-hidroxy-3-metoxifenil)metil]nonanamida
Nonivamida

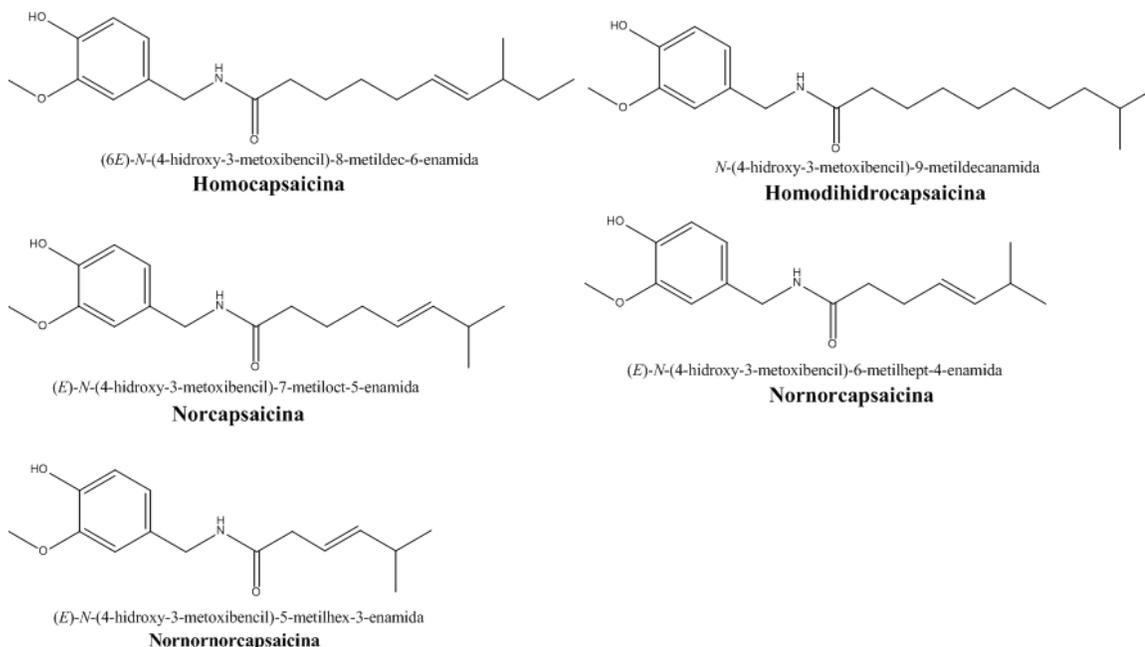


Imagen 1. Tipos de Capsaicinoides presente en el Ají.(Conway, 2008)

Biosíntesis y aplicaciones.

La biosíntesis que conduce a la formación de la capsaicina y sus derivados proviene de dos rutas paralelamente metabólicas, las cuales aportan a la generación del ácido graso. Por lo general éste es sintetizado a través de derivados de la valina, un aminoácido formado a través de una serie de pasos a partir del ácido pirúvico y la otra ruta de formación es aromática, la cual que se deriva de la biosíntesis de fenilpropanoides. Los pasos iniciales de la biosíntesis de fenilpropanoides es similar a las de otras plantas que dan lugar a un número de intermediarios metabólicos, pero los pasos de producción del ferulato a vainillilamida es única para *Capsicum* (Sukrasno & Yeoman, 1993). La capsaicina puede causar dolor en las fosas inmediatamente después del contacto con la piel debido a su acción directa sobre las fibras nerviosas sensoriales, además tiene efectos analgésicos y anti-inflamatorios, propiedades anti-mutagénicas y anti-cancerígenos, posee actividades antioxidantes, previene la obesidad y puede reducir la glucemia postprandial y mejorar la resistencia a la insulina (Denga, et al., 2016).

Medición de la pungencia.

La característica de la pungencia en pimientos picantes se mide por medio de la escala Scoville (SHU), la cual es una función directamente proporcional a la concentración de capsaicinoides presentes en los ajíes. La especie *Capsicum chinese*, conocido popularmente como “Carolina Reaper” ha recibido la atención de la comunidad científica mundial debido a su extrema alta pungencia al medir 1,569,300 SHU y sumado a su aroma único, pues se ha reconocido como el chile más picante del mundo (Guinness World Records, 2013). El nombre de la escala ideada en 1912 se debe a su creador, el farmacéutico estadounidense Wilbur

Scoville. Su método es un poco inespecífico y más cualitativo que cuantitativo, a diferencia de los métodos basados en la cromatografía líquida de alta resolución, pues la escala organoléptica de Scoville es una medición empírica que depende de la sensibilidad del catador de capsaicinoides y por lo tanto no es un método exacto y/o preciso. La manera de presentar un resultado en términos SHU se logra multiplicando la concentración de capsaicinoides en partes por millón (ppm) por el coeficiente del valor de pungencia para cada compuesto, debido a que una parte por millón equivale a 15 SHU (Mathur, Dangi, Dass, & Malhotra, 2000)

Escala (Scoville Heat Units)	Valor sensitivo
0–700 SHU	No pungente
700–3,000 SHU	Poco pungente
3,000–25,000 SHU	Moderadamente pungente
25, 000–70,000 SHU	Altamente pungente
>80,000 SHU	Extremadamente pungente

Tabla 2. Valores sensitivos de pungencia según la escala Scoville (Caterina, et al., 2000)

En medio del proyecto se evaluó material vegetal proveniente de tres tipos diferentes de ajís (Tabasco (*C. frutescens*), Cayena (*C. annum*) y Habanero (*C. chinense*)), los cuales, hacen parte la base de la pasta de ají producida y exportada por la empresa Hugo Restrepo & Cia. S.A. Capsicum andino S.A.C. Dicha característica de pungencia, varía entre las fuentes vegetales en que se extraen los capsaicinoides según diferentes factores ambientales; como la temperatura a la que se cultivan ajís, la posición de la fruta en la planta, la edad de la planta y la intensidad de la luz en el cultivo. Los niveles de capsaicinoides logran variar dependiendo del genotipo y también cambian durante el desarrollo del fruto (DeWitt & Bosland, 1993). Por otra parte, las condiciones nutricionales que ocurren durante el cultivo de pimientos picantes pueden afectar el contenido de capsaicinoides. Por ejemplo, en un estudio no se encontró diferencias significativas en la pungencia en plantas de ají de doble haploides cultivadas en cinco parcelas diferentes del mismo campo (Harvell & Bosland, 1997). A su vez, el contenido total de capsaicinoides que se ha encontrado dependiendo de la estación en el año, ha sido mayor en verano que en otoño (Estrada, Diaz, Merino, & Bernal, 1999). Este tipo de estudios, evidencian la necesidad de contar con un método analítico eficiente que permita cuantificar la fracción total de capsaicinoides principales presentes y de esta manera determinar el nivel de pungencia en términos de unidades SHU por cromatografía líquida de ultra alta eficacia UHPLC.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), constituye de una técnica analítica de separación de uso muy generalizado. Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy selectiva entre compuestos de primordial interés a través de una selección de una columna y eluyentes adecuados hasta sacar partido de todas las interacciones moleculares entre la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria. La columna esta rellena por micropartículas que están diseñadas

para hacer la retención del analito debido a su naturalidad química de interactuar con este. La disminución del tamaño de dichas partículas, aumenta la eficacia de la cromatografía; para el HPLC emplean columnas con micropartículas que van de 2 a 5 μm y bombas que pueden generar una presión de 3000 psi hasta 5800 psi (Rouessac & Rouessac, 2003). Por otra parte, se ha desarrollado una mejor técnica de la misma naturalidad denominada, UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) la cual se caracteriza por tener columnas más pequeñas y compactas con micropartículas de diámetros menores a 2 μm , además de operar con bombas que generan presiones hasta de 15.000 psi para que se genere un flujo adecuado por dichas columnas de naturalidad estrecha (Fountain, 2011), todas estas condiciones extremas para lograr reducciones significativas en los tiempos de análisis y en el consumo de solventes, y así mejorar la sensibilidad y resolución en el análisis. Para llevar a cabo este proyecto, se hizo uso de una técnica híbrida entre el HPLC y el UPLC, conocida como UHPLC, en donde se pueden aplicar presiones hasta de 8700 psi gracias a su sistema de bombas y columnas que cuentan con micropartículas hasta de un tamaño mínimo de 2 μm .

Normatividad de Validación

Según el capítulo <1225> de la USP 39- NF 34, “La validación de un método analítico se define como el procedimiento por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones de análisis previstas.”(United States Pharmacopeial Convention 39 & National Formulary 34, 2016). Ligada a esta normativa esta la guía de validaciones de procedimientos analíticos ICH Q2 R1, la cual establece todos parámetros analíticos e ítems que deben ser considerados dentro de una validación: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad.

La selectividad y especificidad es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de componentes que se pueden esperar de estar presente, estos podrían incluir impurezas, los subproductos de degradación, y la matriz propia; Se desarrolla usando muestras homogéneas y auténticas, sin embargo, cuando no es posible obtener una muestra homogénea que puede ser investigada se desarrollan muestras preparadas artificialmente. La capacidad para obtener resultados de las pruebas que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (dentro de un rango propuesto), hace referencia a la linealidad de un procedimiento analítico y para definir el rango de concentración en el que el método analítico exhibe un comportamiento lineal debe determinarse de antemano el Límite de Cuantificación y el Límite de Detección el cual da una idea de cuál es el valor mínimo del analito en que se puede detectar y medir. La precisión dicta el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones estandarizadas y se expresa normalmente como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones. La exactitud de un procedimiento analítico que expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta ya sea como un valor verdadero convencional o un

valor de referencia aceptado y el valor encontrado. (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 2005)

La conferencia internacional de armonización y la FDA (Food and Drug Administration) recomiendan que los métodos analíticos deben ser sometidos a un buen ejercicio de validación, con el objetivo de demostrar que los datos y resultados obtenidos con dichos métodos son aceptables para el fin previsto que fueron diseñados. Existen metodologías por HPLC validadas para cuantificar la cantidad de capsaicinoides totales en muestras de origen vegetal y oleorresinas, como lo viene siendo la metodología oficial 995.03 que aporta la AOAC a la industria hortofrutícola, la cual maneja los siguientes parámetros cromatográficos:

Parámetro	Valor
Fase estacionaria	columna Stainless C18, 150 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm.
Fase móvil	Acetonitrilo-agua 4:6 (componentes de grado cromatográfico) y ácido acético al 1% (v / v).
Flujo	1.5 mL/min e Isocrático
Detección	Detector UV a 280 nm.
Estándar	Vanillil-N-nonilamida.
Temperatura	(20-25°C)

Tabla 3.(AOAC Official Method 995.03, 1995)

En dicho método oficial, se usa la vainillilamida (Vanillil-N-nonilamida) como muestra estándar para comparar el resto de capsaicinoides que le aportan la mayoría de pungencia a la muestra (Capsaicina, Dihidrocapsaicina y norhidrocapsaicina) y no se utilizan estándares de estas tres moléculas directamente sobre el método, dado que se desarrolla un modelo matemático cuantitativo para detectar la cantidad de capsaicinoides presentes. El método analítico tiene un tiempo de corrida por muestra de 20 min. La ventaja del método estandarizado en el semillero de investigación de productos naturales en la universidad Icesi, en comparación al método de la AOAC, es que el tiempo de análisis se reduce un 25%, de esta manera gastando menos solventes y además hace énfasis en no hacer uso del acetonitrilo, lo que lo hace más amigable con el medio ambiente. Por otro lado la selectividad que se aporta en este nuevo método es más oportuna, pues se incluye la capsaicina y la dihidrocapsaicina como estándares de comparación, de las cuales se construyó una curva de calibración la cual le dio linealidad a la validación.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Validar una metodología analítica de cromatografía líquida UHPLC, teniendo en cuenta los parámetros reportados en la AOAC y en las guías de validaciones internacionales, para la cuantificación total de capsaicinoides proveniente de la pasta de ají, para finales del 2017.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar un protocolo de validación de una metodología cromatográfica en UHPLC, teniendo en cuenta los diferentes parámetros de una validación, para cuantificación de capsaicinoides provenientes de la pasta de ají.
- Evaluar en la nueva metodología analítica propuesta, los parámetros establecidos por normatividad internacional (selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación), para asegurar su idoneidad y validez en la cuantificación de capsaicinoides.
- Llevar a cabo un procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización de la nueva metodología por cromatografía líquida UHPLC para la cuantificación de capsaicinoides en la pasta de ají.

2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA

2.4.1 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO

La descripción detallada de cómo se realizó la presente validación, se encuentra específicamente en el anexo 1: Protocolo de validación de una metodología por medio de UHPLC para la determinación de pungencia de pasta de ají.

2.4.2 MÉTODO ANALÍTICO

Para la extracción de capsaicinoides en la pasta de ají, se hizo uso de una metodología estandarizada en el semillero de productos naturales en la Universidad Icesi, en donde se secó y molió el respectivo material vegetal.

1. Pesar en la balanza analítica 500 mg de la muestra seca y triturada empleando mortero y pistilo. Adicionar el material pesado en un tubo de ensayo mediano con tapa rosca.
2. Agregar 5 mL de Metanol y ponerlo en agitación con ayuda del Vortex por 60s.
3. Asistir el proceso de extracción con ultrasonido por 15 min a 50 °C.
4. Poner el tubo de ensayo de nuevo en el Vortex por 60 s.
5. Filtrar la muestra con ayuda de un embudo de vidrio, el cual contiene una mota de algodón como elemento filtrante. Colectar el filtrado en otro tubo de ensayo.
6. Llenar 2 mL de muestra con ayuda de una jeringa de 3 mL y empleando un filtro de jeringa de 0,2 μm y colectar aproximadamente 1 mL de la solución filtrada a un vial de cromatografía.

CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES.

El método manejó los siguientes parámetros:

Parámetro	Valor	
Fase estacionaria	Columna ZORBAX Eclipse Plus C18 de Agilent, 100 x 3,0 mm, con un tamaño de partícula de 3,5 μm	
Fase móvil	Solvente A	Agua tipo 1 miliQ (0,55 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$)
	Solvente B	Metanol de grado HPLC y ácido acético al 1% (v/v).
Flujo	0,5 mL/min en gradiente.	
Gradiente	0-10 min: 70%→30% solvente A - 30%→70% de solvente B. 10-15 min: 30%→70% solvente A - 70%→30% de solvente B.	
Detección	DAD-CH-1 a 280 nm.	
Estándar de comparación	Capsaicina y Dihidrocapsaicina	
T columna	25°C	

Tabla 4. Parámetros cromatográficos del método de cuantificación por UHPLC

2.4.3 MATRIZ DE MARCO LÓGICO

Objetivo General: Validar una metodología analítica de cromatografía líquida UHPLC, teniendo en cuenta los parámetros reportados en la AOAC y en las guías de validaciones internacionales, para la cuantificación total de capsaicinoides provenientes de la pasta de ají, para finales del 2016.

		Actividades	Indicadores	Supuestos
Objetivos Específicos	1. Realizar un protocolo de validación de una metodología cromatográfica en UHPLC, teniendo en cuenta los diferentes parámetros de una validación, para cuantificación de capsaicinoides provenientes de la pasta de ají.	<ul style="list-style-type: none"> Realizar consulta bibliográfica para la determinación de los parámetros de validación aplicables al método. Revisar el método analítico de cuantificación por UHPLC desarrollado en el semillero de productos naturales. Construir un Protocolo para la respectiva validación del método cromatográfico de UHPLC para la cuantificación del capsaicinoides 	<ul style="list-style-type: none"> Especificaciones adjuntas dentro del protocolo de validación del nuevo de cuantificación de capsaicinoides por UHPLC. 	<ul style="list-style-type: none"> Encontrar información específica acerca de validaciones en matrices alimentarias (Oleorresinas y frutos de ají). Disponibilidad del método analítico desarrollado en el semillero de productos naturales.
	2. Evaluar en la nueva metodología analítica propuesta, los parámetros establecidos por normatividad internacional (Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud, límite de detección y límite de cuantificación), para asegurar su idoneidad y validez en la cuantificación de capsaicinoides.	<ul style="list-style-type: none"> Verificar la existencia de estándar de Capsaicina y Dihidrocapsaicina. Capacitación del manejo de equipo UHPLC. Realizar los cálculos correspondientes para la preparación de soluciones, de acuerdo a los parámetros de validación a evaluar. Preparar muestras a partir de los 	<ul style="list-style-type: none"> Parámetros de validación con sus respectivos análisis estadísticos. Resultados estadísticos cuantitativos de cada parámetro de validación evaluada dentro del protocolo. 	<ul style="list-style-type: none"> Disponibilidad de los estándares, muestras vegetales y comerciales. Disponibilidad y óptimo funcionamiento de equipo UHPLC. Disponibilidad de columna y solventes. Calibraciones y calificaciones actualizadas de cada

		<p>estándares de los capsaicinoides para la evaluación de cada respectivo parámetro.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Análisis cuantitativo de muestras preparadas a partir alícuotas provenientes de una solución madre construida con los estándares de los capsaicinoides, en cromatógrafo UHPLC. • Procesamiento, generación de reportes. y de datos en el equipo de UHPLC. • Aplicar el tratamiento estadístico correspondiente a cada estudio e ítem en la validación. • Realizar informe y resultados de validación con las conclusiones correspondientes que irán anexadas al documento de PDGII. 		<p>instrumento y equipo que se use en la validación.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de software estadístico.
	<p>3. Llevar a cabo un procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización de la nueva metodología por cromatografía UHPLC para la cuantificación de capsaicinoides en la pasta de ají.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar los ajustes efectuados durante la validación, si los hay, de las condiciones cromatográficas del método. • Realizar un procedimiento operativo estándar (POE). 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimiento operativo estándar (POE) de método de cuantificación de Capsaicinoides para la determinación de pungencia en términos de grado Scoville en la pasta de ají. 	<ul style="list-style-type: none"> • El método obtenido es reproducible, repetitivo exacto, preciso, específico, posee linealidad y límites de detección y cuantificación.

3. RESULTADOS

3.1 SELECTIVIDAD

Tabla5. Muestras a 250 ppm (Metanol + estándar) para cada capsaicinoide.

Muestra	Área	
	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
1	2501311	2411607
2	2505990	2421921
3	2472610	2392811
4	2495609	2414687
5	2477533	2347558
6	2546920	2419750
Promedio	2499996	2401389
Desviación est.	26507,901	28324,167
%RSD	1,060	1,179

Tabla6. Muestras de Placebo Enriquecido con 250ppm para cada capsaicinoide.

Muestra	Área	
	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
1	2486166	2341906
2	2522270	2381807
3	2486577	2368899
4	2564871	2341980
5	2562126	2357761
6	2582194	2343951
Promedio	2534034	2356051
Desviación est.	41812,368	16588,254
%RSD	1,650	0,704

$$\%D = \frac{|D_s - D_i|}{D_s} \times 100\%$$

Ec 1. % de Discrepancia.

D_s = Promedio de la muestra a 250ppm.

D_i = Promedio del placebo enriquecido.

$$\%D_{Capsaicina} = \frac{|2499996 - 2534034|}{2499996} \times 100\% = 1,362\%$$

Resultados de Discrepancia para la selectividad del método

	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
% Discrepancia	1,362%	1,888%

Criterio de aceptación: El método es selectivo si %Discrepancia para cada capsaicinoide es menor al 2% de discrepancia

3.2 LINEALIDAD

Tabla7. Curva de calibración de la capsaicina en la linealidad.

Repetición	400	160	80	40	20
1	3908823	1473762	733762	349121	187271
2	3918289	1481275	751482	364017	183016
3	3885761	1484626	740278	350406	192087
Promedio	3904291	1479888	741841	354515	187458
Desv Est	16730,869	5563,285	8962,759	8254,306	4538,39
Varianza	279921977	30950140	80331049	68133568	20596984
%RSD	0,429	0,376	1,208	2,328	2,421
M	9815,1724				
B	-40525,73				
R ²	0,99958				
G experim.	0,583				
G tabulado.	0,68				

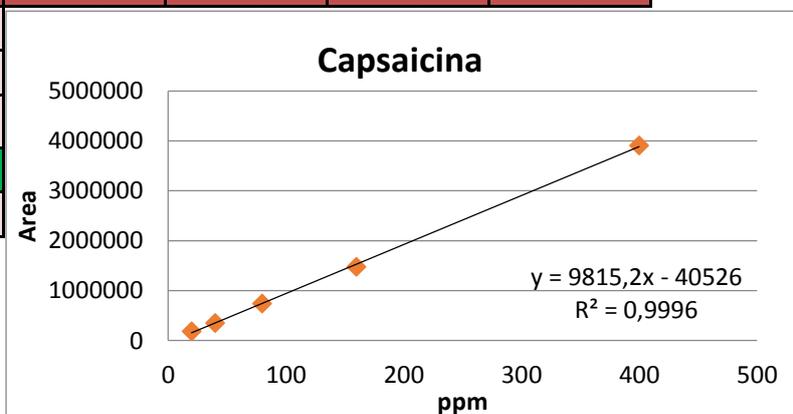


Gráfico 2. Curva de calibración de la capsaicina

Tabla8. Curva de calibración de la Dihidrocapsaicina en la linealidad.

Repetición	400	160	80	40	20
1	4021093	1528551	720430	357852	175000
2	3981883	1515751	733028	368654	167504
3	4018421	1532671	713156	372017	176209
Promedio	4007132	1525658	722205	366174	172904
Desv Est	21907,339	8823,272	10054,16	7400,903	4715,731
Varianza	479931502	77850129	1,01E+08	54773365	22238119
%RSD	0,547	0,578	1,392	2,021	2,727
M	10121,555				
B	-58203,1				
R ²	0,99963				
G experim.	0,652				
G tabulado.	0,68				

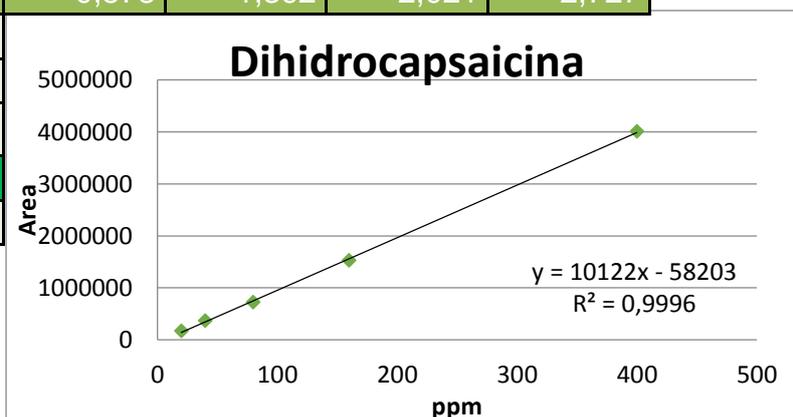


Gráfico 3. Curva de calibración de Dihidrocapsaicina

$$G_{exp} = \frac{S_{max}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 + S_5^2}$$

Ec 2. G experimental

S_i^2 : Varianza para cada nivel

$$G_{exp,capsaicina} = \frac{279921977}{279921977 + 30950140 + 80331049 + 68133568 + 20596984} = 0,583$$

Tabla 9. Datos ANOVA: Regresión en la curva de calibración de la Capsaicina.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Valor F tablas F(0.05, 4, 10)
Entre grupos	2,776E+13	4	6,939E+12	72293,431	2,967E-22	3,478	3,480
Dentro de los grupos	959867402	10	95986740,2				
Total	2,776E+13	14					

Tabla 10. Prueba t-Student en la curva de calibración de la Capsaicina.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor t-Student t(0,05, 14)
Intercepción (b)	-40525,73	11414,127	-3,550	1,771
Pendiente (m)	9815,1724	57,946451	169,383	1,771

Tabla 11. Datos ANOVA: Regresión en la curva de calibración de la Dihidrocapsaicina

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Valor F tablas F(0.05, 4, 10)
Entre grupos	2,952E+13	4	7,379E+12	50136,007	1,849E-21	3,478	3,480
Dentro de los grupos	1,472E+09	10	147175863,7				
Total	2,952E+13	14					

Tabla 12. Prueba t-Student en la curva de la Dihidrocapsaicina

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor t-Student t(0,05, 14)
Intercepción (b)	-58203,1	11288,896	-5,156	1,771
Pendiente (m)	10121,555	57,310688	176,609	1,771

	Hipótesis:	Criterio de aceptación:
Homogeneidad de varianzas	Ho: las varianzas de los 5 niveles de concentraciones son equivalentes y no influyen en la variabilidad de los resultados	Si $G_{experimental} < G_{tabulado}$, se acepta H_0

	Ha: las varianzas de los 5 niveles de concentraciones no son equivalentes e influyen en la variabilidad de los resultados	
<u>Normalidad de residuales</u>	Ho: % de valoración y área no se relacionan linealmente.	Si $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$, se rechaza H_0 y existe relación lineal entre las variables.
	Ha: % de valoración y área se relacionan linealmente.	
<u>Intervalos de confianza para la pendiente</u>	Ho: $m=0$	Si $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$, se Rechaza H_0 entonces la pendiente no toma valores de cero y el método responde a los cambios de concentración.
	Ha: $m \neq 0$	
<u>Intervalos de confianza para el intercepto</u>	Ho: El intercepto no incluye el cero.	Si $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$, se Rechaza H_0 entonces el intercepto incluye cero y el método es proporcional.
	Ha: El intercepto incluye el cero.	

3.3 PRECISIÓN

3.3.1 REPETIBILIDAD

3.3.1.1 REPETIBILIDAD INSTRUMENTAL

Tabla 13. Muestras a 250 ppm para cada capsaicinoides para la repetibilidad instrumental.

Muestra	Área	
	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
1	2480911	2435607
2	2484790	2432421
3	2534223	2474926
4	2440610	2383111
5	2475409	2425087
6	2435335	2402842
7	2506720	2440150
8	2492327	2444668
Promedio	2481290,625	2429851,500
Des	32478,800	27604,126
%RSD	1,309	1,136

$$\%RSD = \frac{\text{Desviacion Est.}}{\text{Promedio}} \times 100\%$$

Ec 3. Coeficiente de variación

3.3.1.2 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Tabla 14. Curva de calibración de la capsaicina en la repetibilidad del método.

CURVA CAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3943956	1617334	747223	390898	206514
2	3976170	1591552	769764	411776	211297
3	4025348	1555334	782767	384035	202748
Promedio	3981825	1588073	766585	395570	206853
Desv Est	40989,582	31146,041	17984,024	14448,499	4284,570
%RSD	1,029	1,961	2,346	3,653	2,071
m	9965,224				
b	-7350,249				
R ²	0,99992				

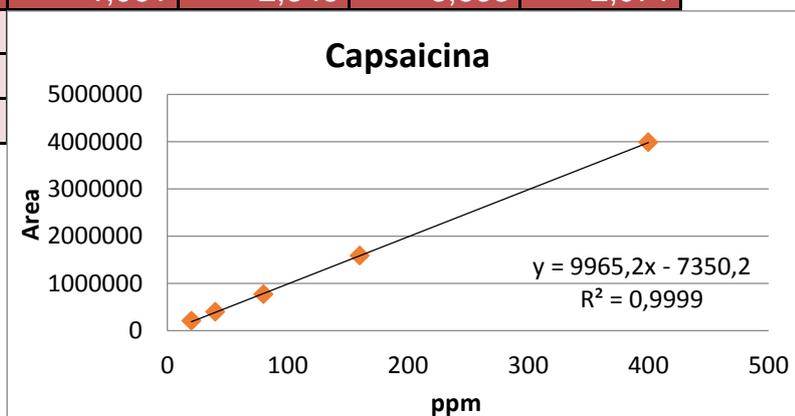


Gráfico 4. Curva de calibración de la capsaicina

Tabla 15. Curva de calibración de dihidrocapsaicina en la repetibilidad del método.

CURVA DIHIDROCAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3794067	1540183	719140	392781	193142
2	3834437	1542472	702135	384735	202646
3	3875589	1496239	731673	389301	198997
Promedio	3834698	1526298	717649	388939	198262
Desv Est	40761,625	26057,005	14825,314	4035,197	4794,480
%RSD	1,063	1,707	2,066	1,037	2,418
m	9602,116				
b	-11127,044				
R ²	0,99976				

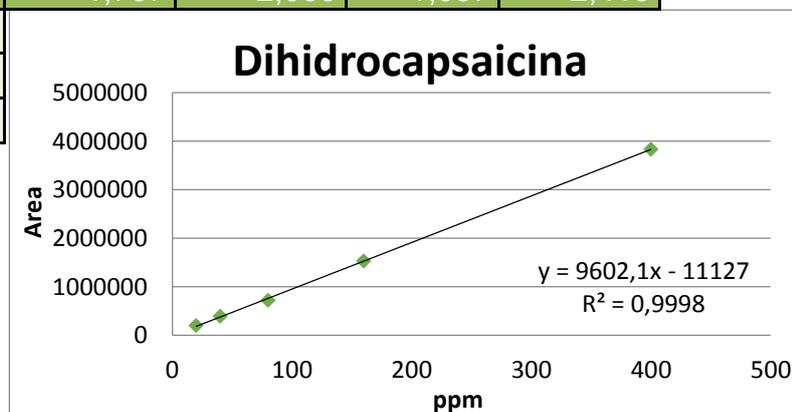


Gráfico 5. Curva de calibración de dihidrocapsaicina

Tabla 16. Muestras evaluar en la repetibilidad del método.

Muestra	Capsaicina		Dihidrocapsaicina	
	Área	ppm	Área	ppm
1 (360 ppm)	3593416	361,333	3475897	363,152
2 (360 ppm)	3559456	357,925	3408939	356,178
3 (360 ppm)	3608443	362,841	3469608	362,497
Promedio		360,700		360,609
Desv Est		2,518		3,851
%RSD		0,698%		1,068%
4 (200 ppm)	1978142	199,242	1894023	198,409
5 (200 ppm)	1950633	196,482	1850259	193,852
6 (200 ppm)	1956788	197,099	1870455	195,955
Promedio		197,608		196,072
Desv Est		1,449		2,281
%RSD		0,733%		1,160%
7 (60 ppm)	581768	59,117	568020	60,315
8 (60 ppm)	596043	60,550	555409	59,001
9 (60 ppm)	601948	61,142	556677	59,133
Promedio		60,270		59,483
Desv Est		1,041		0,723
%RSD		1,327%		1,216%

Intervalos de confianza:

$$\bar{x} \pm \left(t \times \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

\bar{x} = Media

t= valor t student para n-1 grados de libertad y $\alpha=0.05$ (2,0.05) = 2,92

Ec 4. *Calculo para los intervalos de confianza experimentales.*

s=Desviación estándar

n=Número de análisis

Tabla 17. Intervalos de confianza introducidos en la repetibilidad del método.

Concentración	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
C1 (360ppm)	356,455 – 364,945 ppm	354,117 – 367,101 ppm
C2 (200ppm)	195,165 – 200,151 ppm	196,226 – 200,117 ppm
C3 (60ppm)	58,515 – 62,025 ppm	58,264 – 60,702 ppm

3.3.2 PRECISIÓN INTERMEDIA

Para cada análisis dependientemente de los dos días y del analista que puso a prueba el método, fue necesario construir varias curvas de calibración (4 de Capsaicina y 4 de Dihidrocapsaicina), las cuales se encuentran en la parte de los anexos (Anexo 2.)

DIA 1

Tabla 18. Muestras evaluar en la precisión intermedia para el día 1.

Muestra	Analista #1				Analista #2			
	Capsaicina		Dihidrocapsaicina		Capsaicina		Dihidrocapsaicina	
	Área	ppm	Área	Ppm	Área	ppm	Área	ppm
1 (360 ppm)	3593416	361,333	3475897	363,152	3390433	363,352	3340944	359,763
2 (360 ppm)	3559456	357,925	3408939	356,178	3423856	366,916	3312534	356,717
3 (360 ppm)	3608443	362,841	3469608	362,497	3369759	361,148	3297425	355,097
Promedio		360,700		360,609		363,805		357,192
Desv Est.		2,518		3,851		2,911		2,369
%RSD		0,70%		1,07%		0,80%		0,66%
4 (200 ppm)	1978142	199,242	1894023	198,409	1874489	201,708	1808696	195,452
5 (200 ppm)	1950633	196,482	1850259	193,852	1795895	193,327	1882749	203,393
6 (200 ppm)	1956788	197,099	1870455	195,955	1860261	200,190	1861513	201,116
Promedio		197,608		196,072		198,408		199,987
Desv Est.		1,449		2,281		4,465		4,089
%RSD		0,73%		1,16%		2,25%		2,04%
7 (60 ppm)	581768	59,117	568020	60,315	556459	61,167	533173	58,670
8 (60 ppm)	596043	60,550	555409	59,001	530188	58,365	538930	59,288
9 (60 ppm)	601948	61,142	556677	59,133	548754	60,345	558025	61,335
Promedio		60,270		59,483		59,959		59,764
Desv Est.		1,041		0,723		1,440		1,395
%RSD		1,73%		1,22%		2,40%		2,33%

DIA 2

Tabla 19. Muestras evaluar en la precisión intermedia para el día 2.

Muestra	Analista #1				Analista #2			
	Capsaicina		Dihidrocapsaicina		Capsaicina		Dihidrocapsaicina	
	Área	ppm	Área	ppm	Área	ppm	Área	ppm
1 (360 ppm)	3492408	359,946	3539225	355,964	3547579	363,077	3582338	361,425
2 (360 ppm)	3526661	363,436	3550809	357,110	3521707	360,460	3525039	355,718
3 (360 ppm)	3519580	362,715	3581380	360,136	3540329	362,343	3516507	354,868
Promedio		362,032		357,737		361,960		357,337
Desv Est.		1,842		2,156		1,350		3,566
%RSD		0,51%		0,60%		0,37%		1,00%
4 (200 ppm)	1953848	203,193	1958257	199,473	1950109	201,498	1953915	199,226
5 (200 ppm)	1927310	200,489	1927588	196,438	1933376	199,805	1971407	200,968
6 (200 ppm)	1901489	197,858	1967944	200,432	1942181	200,696	1983855	202,208
Promedio		200,514		198,781		200,666		200,801
Desv Est.		2,667		2,085		0,847		1,498
%RSD		1,33%		1,05%		0,42%		0,75%
7 (60 ppm)	569145	62,115	560994	61,167	565025	61,401	539337	58,327
8 (60 ppm)	551451	60,312	553599	60,435	543838	59,258	558680	60,254
9 (60 ppm)	551726	60,340	539326	59,022	542841	59,157	563739	60,758
Promedio		60,923		60,208		59,939		59,780
Desv Est.		1,033		1,090		1,267		1,283
%RSD		1,70%		1,81%		2,11%		2,15%

Criterio de aceptación: El método cumple con la precisión intermedia si ningún valor de %RSD para cada nivel de concentración para cada capsaicinoide es menor al **2,68%** (el doble comparado con el RSD propuesto para la repetibilidad del método)

3.4 EXACTITUD

Para procesar los resultados y el análisis de este parámetro no fue necesario realizar más ensayos, pues los datos del día 2 y del analista 1 (quien lidero los resultados en toda la validación) se hicieron de la repetibilidad intermedia

Tabla 20. Muestras evaluar en la exactitud del método.

Muestra	Capsaicina		Dihidrocapsaicina	
	Área	ppm	Área	ppm
1 (360 ppm)	3492408	359,946	3539225	355,964
2 (360 ppm)	3526661	363,436	3550809	357,110
3 (360 ppm)	3519580	362,715	3581380	360,136
Promedio		362,032		357,737
Desviación Est		1,842		2,156
Varianza		3,394		4,647
% Recuperación		100,565%		99,371%
4 (200 ppm)	1953848	203,193	1958257	199,473
5 (200 ppm)	1927310	200,489	1927588	196,438
6 (200 ppm)	1901489	197,858	1967944	200,432
Promedio		200,514		198,781
Desviación Est		2,667		2,085
Varianza		7,115		4,349
% Recuperación		100,257%		99,391%
7 (60 ppm)	569145	62,115	560994	61,167
8 (60 ppm)	551451	60,312	553599	60,435
9 (60 ppm)	551726	60,340	539326	59,022
Promedio		60,923		60,208
Desviación Est		1,033		1,090
Varianza		1,067		1,189
% Recuperación		101,538%		100,346%
G Experimental		0,6146		0,4563
G Tabulado		0,8709		0,8709
T Experimental		2,0024		0,7726
T Tabulado		2,3060		2,3060

$$(R)\% = \frac{\text{Valor medio hallado}}{\text{Valor aceptado como verdadero}} \times 100\% \quad \text{Ec 5. \% de recuperación}$$

$$t_{\text{Experimental}} = \frac{|100 - \bar{x}| \times \sqrt{n}}{CV} \quad \text{Ec 6. } T \text{ Experimental}$$

\bar{x} = promedio de todos los % de recuperación.

CV= = promedio de todos los %RSD.

n= Número de análisis (9)

Hipótesis:	Criterio de aceptación:
Ho: las varianzas de las tres concentraciones utilizadas (60, 200, 3600 ppm) son equivalentes y no influyen en la variabilidad de los resultados	Acepto Ho Si $G_{Exp} < G_{Tab}$
Ha: las varianzas de las tres concentraciones utilizadas (60, 200, 3600 ppm) no son equivalentes e influyen en la variabilidad de los resultados	
Ho: No existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% de las concentraciones teóricas	Acepto Ho Si $T_{Exp} < T_{Tab}$
Ha: Existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% de las concentraciones teóricas	

3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Tabla 21. Curva de calibración de la capsaicina para hallar el LDD y LDC.

Repetición	20	10	4
1	191361	98442	24885
2	197339	98063	33043
3	206164	98593	26002
Promedio	198288	98366	27977
Desv Est.	7446,989	273,051	4422,977
%RSD	3,756	0,278	15,810
Ym	10577,901		
Yb	-11672,660	Sb	1294,597
R ²	0,9981		
b (linealidad)	40525,731		

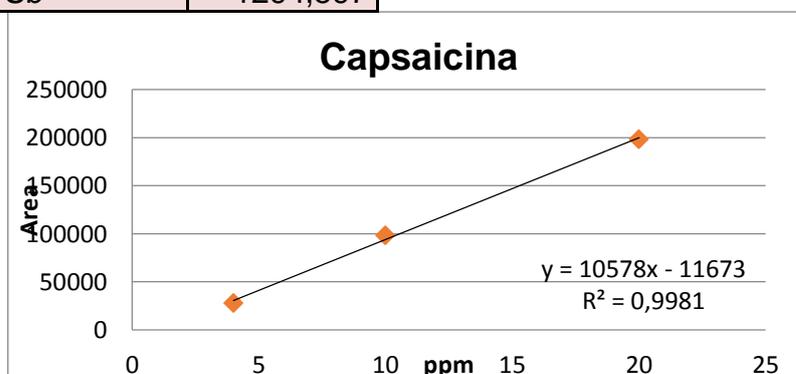


Gráfico 6. Curva de calibración de la capsaicina en el LDD y LDC.

Tabla 22. Curva de calibración de Dihidrocapsaicina para hallar el LDD y LDC.

Repetición	20	10	4
1	175493	86253	38562
2	186970	93960	40141
3	194491	83107	34539
Promedio	185651	87773	37747
Des	9567,401	5583,947	2888,488
%RSD	5,153	6,362	7,652
Ym	9299,490		
Yb	-1670,218	Sb	1304,455
R ²	0,9983		
b (linealidad)	58203,101		

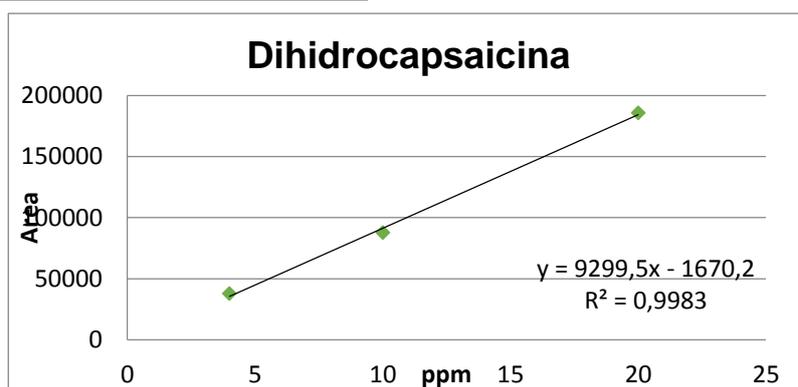


Gráfico 7. Curva de calibración de la Dihidrocapsaicina en el LDD y LDC.

$$C_l = \frac{Y_{bl} + (K \times S_b)}{b \times \sqrt{n}}$$

Ec 7. Cálculo para el LDD y LDC

C_l = Concentración en el límite de detección o cuantificación.

Y_b = Intercepto de la recta en la recta de LDD y LDC.

K = Constante (3 para el LD y 10 para el LC).

S_b = Intercepto de la recta Desviación estándar vs Concentración.

b = Intercepto fijado en la linealidad del método.

n = Número de muestras.

Tabla 23. LDD y LDC para cada capsaicinoide

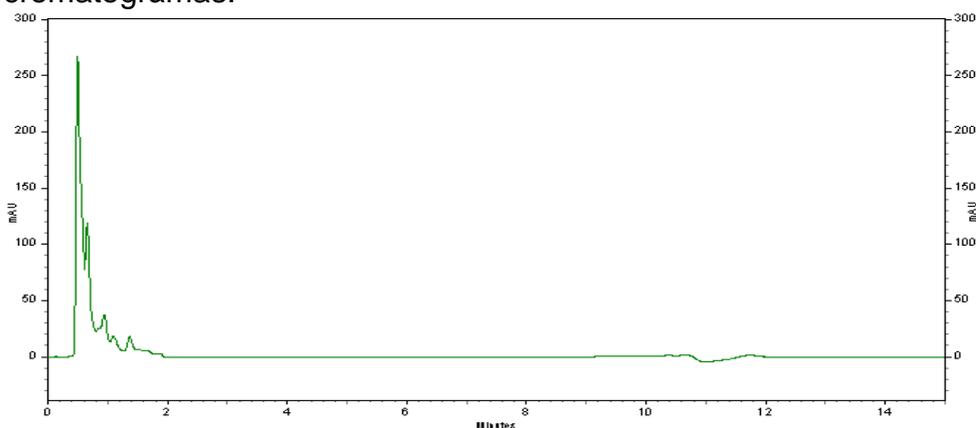
Capsaicina		Dihidrocapsaicina	
B	40525,731	b	58203,101
Yb cap.	11672,660	Yb Dih.	1670,218
Sb	1294,597	Sb	1304,455
n	3	n	3
LDD (ppm)	0,222	LDD (ppm)	0,055
LDC (ppm)	0,351	LDC (ppm)	0,146

4. DISCUSIÓN

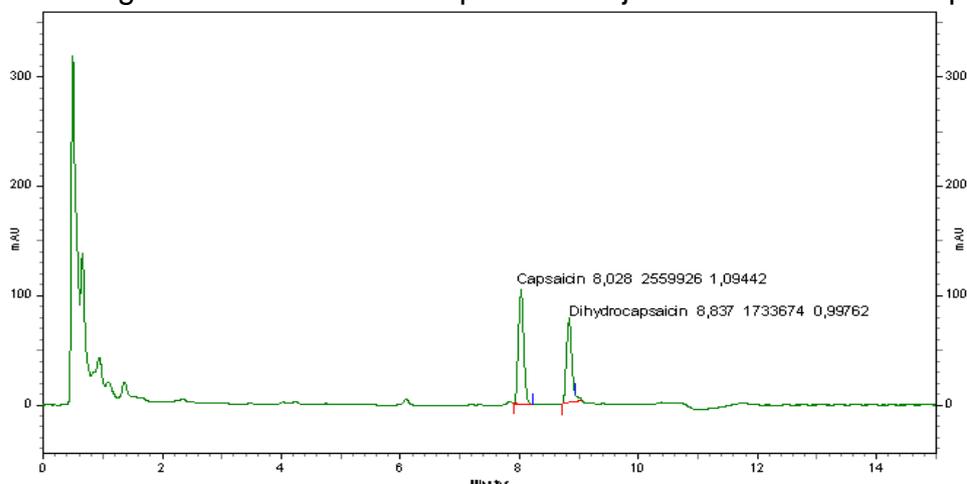
Es necesario discutir y analizar de parámetro en parámetro y al final de este análisis global se podrán sacar conclusiones y recomendaciones que se surgieron a través de la presente validación.

Selectividad

Este fue el primer parámetro evaluado, pues se considera que es el que dará el indicio para saber si el método tiene la capacidad de medir, separar y/o identificar simultánea o separadamente los capsaicinoides de interés de forma inequívoca y sin interferencias de impurezas y compuestos relacionados. Para analizar si este parámetro cumple o no con la anterior especificación fue necesario realizar dos experimentos, el primero consistió en construir una matriz que no contenía ningún tipo de capsaicinoides usando el método de extracción y de cuantificación con una muestra de pimentón rojo seco y molido, pues dicha especie es del género *Capsicum* y no posee algún tipo de capsaicinoides (Barbero, et al., 2014). También se elaboró otra muestra de placebo cargado, el cual estaba compuesto por la misma matriz mencionada anteriormente, pero en este caso se le agregaron la capsaicina y dihidrocapsaicina de manera artificial a concentraciones de 250 ppm para cada uno. Los resultados de este primer experimento arrojó los siguientes cromatogramas:



Cromatograma 1. Matriz de la pasta de aji con ausencia de capsaicinoides.



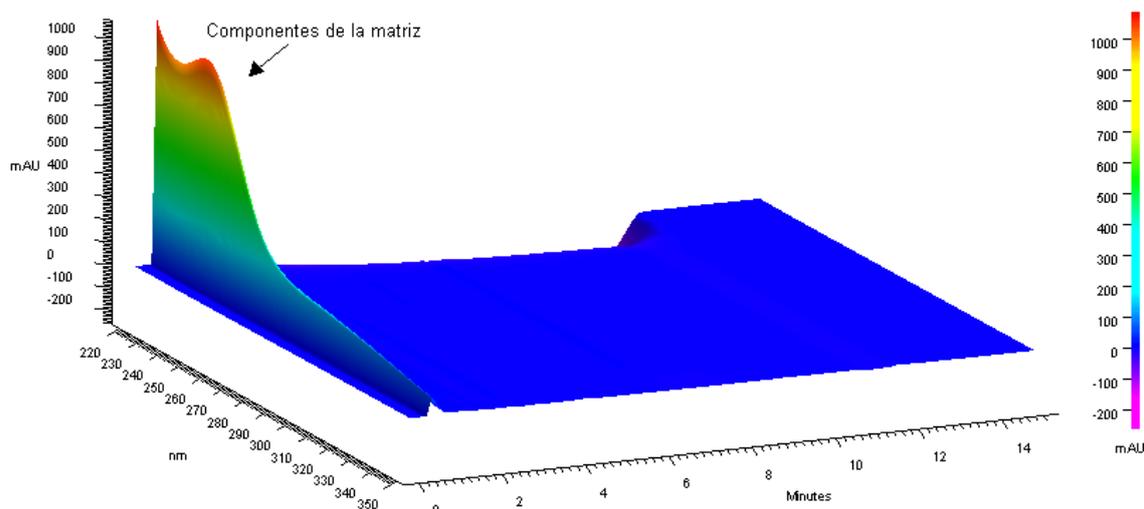
Cromatograma 2. Matriz de la pasta de aji con capsaicinoides agregados artificialmente a una concentración de 250ppm.

Según las anteriores pruebas, el método de separación y detección es apropiado a la hora de generar una respuesta selectiva y efectiva, ya que están dentro de los estándares técnicos y fundamentales en una corrida cromatográfica, pues la resolución de las bandas de capsaicina y de dihidrocapsaicina fue de 1,094 y 0,997 respectivamente (Tabla 24). Se considera que una resolución cercana a 1 es de alta confianza y evidencia una respuesta efectiva y selectiva(Gomis Yagües, 2008).

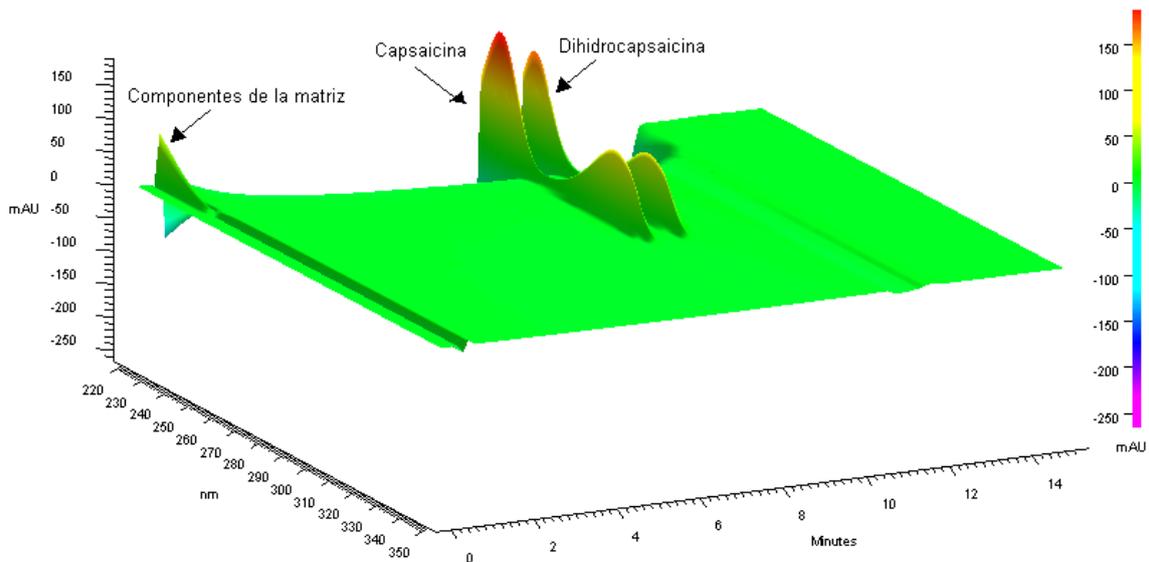
Nombre	Retención Time	Área	Resolución
Capsaicina	8,028	2559926	1,09442
Dihidrocapsaicina	8,837	1733674	0,99762

Tabla24. Características cromatográficas para la capsaicina y dihidrocapsaicina

Para asegurar una respuesta selectiva, no basta solo determinar el tiempo de retención y resolución de cada uno de los analitos de interés, y es necesario la comprobación de ausencia de interferencias y que estas no afectaran la respuesta y/o resultados generando la aparición de falsos positivos. Para confirmar esta información se implementa otra aplicación a la hora de detectar los capsaicinoides como es el Detector de Arreglo de Diodos (DAD), pues este permite evaluar la coelución de analitos en un mismo pico cromatográfico, es decir evaluar que existan otras sustancias que se superpongan en la banda cromatográfico (AEFI, 2001). En los siguientes análisis generados por el DAD en la selectividad del presente método, se puede observar que no existen interferencias de otros compuestos y que los picos de la capsaicina y dihidrocapsaicina son puros y homogéneos:



Grafica DAD. Tiempo de retención vs Absorbancia vs Longitud de onda, para capsaicina y dihidrocapsaicina en la muestra placebo.



Grafica DAD. Tiempo de retención vs Absorbancia vs Longitud de onda, para capsaicina y dihidrocapsaicina en la muestra placebo enriquecido a 250ppm de capsaicinoides.

Con el fin de determinar la influencia de la presencia de impurezas, sustancias relacionadas y productos de degradación en los resultados de la metodología, para el segundo experimento en la selectividad se compararon las respuestas de las áreas para 6 muestras elaboradas a 250 ppm (Etanol + Capsaicinoides) y 6 muestras de placebo enriquecido a 250 ppm (Matriz + Capsaicinoides). Los resultados de estas pruebas (Tablas 5 y 6) sugieren que el porcentaje de discrepancia para cada capsaicinoide no superan el 2% cuyo valor se propuso en el procedimiento de la presente validación (Anexo 2). Este resultado sostiene que **la influencia de la matriz y todos sus componentes influyen menos del 2% en los resultados en la lectura de cuantificación para la capsaicina y la dihidrocapsaicina**. Sin embargo para obtener un resultado estadístico adicional que nos confronte los resultados de las dos muestras se aplicó una prueba t de Student-Fisher de comparación de dos medias con grupos independientes:

Tabla25. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para la capsaicina

	<i>Muestra 250ppm</i>	<i>Placebo Enriquecido con 250 ppm</i>
Media	2499996	2534034
Varianza	702668834	1748274120
Observaciones	6	6
Coeficiente de correlación de Pearson	0,480	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	5
T estadístico para capsaicina	-2,239	

Tabla26. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para la dihidrocapsaicina

	<i>Muestra 250ppm</i>	<i>Placebo Enriquecido con 250 ppm</i>
Media	2401389	2356050,667
Varianza	802258464	275170161
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,097	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	5
T estadístico para dihidrocapsaicina	3,249	

T Tabulado (0.05, 5,5) = **5,05**

Hipótesis:

Ho: No existen diferencias significativamente estadísticas en la comparación de las áreas cromatográficas de las muestras con y sin matriz.

Ho: Existen diferencias significativamente estadísticas en la comparación de las áreas cromatográficas de las muestras con y sin matriz.

- Si $T_{est} < T_{tab}$, acepto Ho

Conclusión: Acepto Ho, aun se sostiene que en la respuesta de lectura **no existen diferencias significativas dada la influencia que pueden generar los componentes secundarios que aporta la matriz y el método es selectivo para la lectura de ambos capsaicinoides al tiempo en el mismo medio.**

Linealidad

En este punto de la validación se evaluó la capacidad del método para generar datos que fueran proporcionales con respecto a la concentración de los capsaicinoides, con el propósito de adecuar una transformación matemática que abarque ambas variables (áreas cromatográficas vs la concentración de capsaicinoides) en un rango de concentraciones establecidos (20ppm – 400ppm), se determinó que dicha forma matemática que se acopla al comportamiento de las áreas con respecto a la concentración de los analitos tiene una forma lineal de la manera $Y = mX + b$, ya que en la regresión lineal el coeficiente de determinación (r^2) en todas las curvas de calibración realizadas siempre fue muy cercano a uno. Tal coeficiente indica el grado de relación entre una variable x (concentración de capsaicinoides) y la variable Y respuesta (Áreas cromatografías) y su valor recomendable es $\geq 0,999$.

Se realizaron unos supuestos para comprobar la totalidad de la linealidad en la validación:

1. Un análisis de varianza ANOVA para la Capsaicina y la Dihidrocapsaicina. Para utilizar esta herramienta las pruebas realizadas en las tablas 9 y 10, tuvieron que cumplir los siguientes supuestos:
 - a) Homogeneidad de varianzas: Pronosticara si la variable concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Para llegar a esta conclusión se realizó un test de cochran calculando el valor $G_{\text{experimental}}$ para cada capsaicinoide con ayuda de las varianzas para cada grupo de concentraciones y se comparó con el valor G_{tabulado} . Planteando las hipótesis en los resultados de la linealidad (3,2 Linealidad) se concluyó que **Existe una homogeneidad para cada capsaicinoide en las varianzas y que la variable concentración influye en la variabilidad de la variable áreas cromatográficas.**
 - b) Normalidad de residuales: Para este test se comprobó mediante la representación gráfica para cada curva de calibración de capsaicina y dihidrocapsaicina (grafico 2 y 3) y la comparación de $F_{\text{experimental}}$ y $F_{\text{crítico}}$ para cada capsaicinoide con respecto a F_{tabulado} que arrojó el análisis ANOVA para cada curva de calibración, que **existe una pendiente estadísticamente muy distinta de 0 y una linealidad entre los resultados obtenidos para cada curva de calibración de capsaicinoides.**
2. Test de linealidad:
 - Significación de la desviación de la pendiente: Con esta herramienta estadística **se logró comprobar y rectificar que existe una pendiente distinta de cero para cada curva de calibración de capsaicinoides mediante una prueba T de Student.** Para este caso se comparó con el valor experimental hallado 169,38 para capsaicina y 176,609 para dihidrocapsaicina con el valor hallado en la tabla t-student de 1,771 para la distribución para 14 grados de libertad con la significación de alfa igual a 0,05.
 - Test de proporcionalidad: Permitió evaluar y comprobar que **la recta pasa por el origen de coordenadas y determino que variable independiente es significativamente distinta de cero.** Para llegar a esta conclusión se comparó mediante una prueba T para cada capsaicinoide el valor $T_{\text{experimental}}$ (-3,550 para capsaicina y -5,156 para dihidrocapsaicina) con respecto al T hallado en la tabla T-student de 1,771 para la distribución para 14 grados de libertad con la significación de alfa igual a 0,05. Como T_{Tabulado} es mayor en ambos casos para cada capsaicinoide con respecto a sus $T_{\text{experimental}}$, acepto la hipótesis nula y se llegó a esa conclusión.

Precisión

Este parámetro se divide por varios ítems de evaluación, iniciando por la **repetibilidad instrumental**, la cual evalúo la variabilidad debida únicamente al instrumento analítico en el método (UHPLC) y se determinó analizando

repetidamente una misma muestra 8 veces consecutivamente. La estimación de la repetibilidad instrumental se realizó con ayuda del cálculo del porcentaje de coeficiente de variación (%RSD) (Ecuación 3) de las respuestas para cada especie de capsaicinoide. Los resultados de estas pruebas (3.3.1.1 Repetibilidad instrumental) arrojaron un %RSD de 1,309% para la Capsaicina y 1,136% para la Dihidrocapsaicina. Para materias primas y especialidades farmacéuticas se acostumbra aceptarse valores inferiores al **2%**, este valor se tomó en cuenta para confrontar los resultados, pues la presente validación estuvo destinada a someterse a las estrictas especificaciones que tiene una validación del ámbito farmacéutico. De esta manera, **dicha medida de dispersión señala un 1,309% para la Capsaicina y 1,136% para la Dihidrocapsaicina de variabilidad en relación con cada media correspondiente.**

Para evaluarla variabilidad del método en condiciones operativas (el mismo analista, instrumentos de laboratorios, equipo instrumental analítico y reactivos) se determinó la **repetibilidad del método**. Para llevar a cabo este estudio se realizó una serie de alícuotas a partir de una solución madre. Dichas disoluciones estaban dentro del rango de cuantificación y se componían de tres niveles de concentración: alto, medio y bajo (360, 200 y 60 ppm). El experimento se hizo por triplicado para cada nivel obteniendo un análisis total de 9 muestras más su curva de calibración. Luego de ser procesadas las muestras se procedió a calcular el porcentaje de coeficiente de variación y los coeficientes de confianza para cada nivel de concentración (Tabla 16 y 17). Dichos resultados se compararon, por parte del porcentaje de coeficiente de variación con el valor correspondiente a un intervalo de aceptación entre el 98% -102,0% igual a 1,34%, según como lo señala la tabla en el anexo 2. Como resultado se obtuvo que **ningún valor en la repetibilidad del método supero el 1,34%, cumpliendo con las especificaciones de precisión en este ítem. Este valor describe la cantidad de variabilidad en relación con cada media para cada nivel de concentración.**

Se introdujeron intervalos de confianza (tabla 17) al estudio de precisión en la presente validación, así como lo recomienda la ICH Q2B recomienda introducir intervalos.(ICH, 1996) **Los intervalos que se hallaron experimentalmente están dentro de los rangos para cada nivel de concentración.**

Para concluir con los estudios de precisión se evaluó la **precisión intermedia** para determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra haciendo uso del mismo aparato instrumental, pero en condiciones operativas distintas; usando diferentes analistas, instrumentos de laboratorios y dos evaluaciones en distintos días. Para estudiar dichos factores que pueden afectar la variabilidad de las respuestas (Analistas y Días de evaluación), se realizó un estudio matricial (literal 9.6.3.2.1, anexo 2) preparando independientemente cada muestra por triplicado a tres niveles de concentración, de la misma manera que se realizó en la repetibilidad del método. La estimación de este parámetro se llevó a cabo con ayuda del cálculo de %RSD (Ecuación 3) de una manera global, es decir comparando el %RSD de referencia individualmente para cada resultado por día. Normalmente se aceptan valores de porcentajes de coeficiente de variación en la precisión intermedia inferiores al doble del de referencia en la repetibilidad del método,

es decir que para este caso se comparó con un %RSD de **2,68%**. Este valor describe la máxima cantidad de variabilidad que puede existir en relación con cada media para cada nivel de concentración. El resultado que se obtuvo en estas pruebas expreso que **ningún valor en la precisión intermedia supero el 2,68% de coeficiente de variación, cumpliendo con las especificaciones de precisión en este ítem.**

Exactitud

La evaluación de este componente expreso la proximidad entre el valor que se considera como verdadero y el valor experimental encontrado. Se analizó realizando 9 determinaciones sobre tres niveles de concentración (como se evaluó en la Repetibilidad del método, y así lograr un total de 9 muestras más la curva de calibración correspondiente) a estos datos se les calculo un porcentaje de recuperación (Ecuación 5). Dichos resultados de porcentaje de recuperación (tabla 20) estuvieron entre el 98,0% - 102,0%, valor que se propuso en las especificaciones establecidas en el protocolo de validación, por lo tanto **el método es exacto, pues el valor de respuesta experimental se acerca entre el 98% - 102% al valor considerado como verdadero en cada nivel de concentración para cada especie de capsaicinoide en la muestra,** sin embargo para comprobar que esta afirmación es estadísticamente consistente fue necesario realizar las siguientes pruebas estadísticas:

Prueba de Cochran: Es un test de igualdad de variancias de varios grupos muestrales del mismo tamaño. Según los resultados expuestos en la tabla 20, se determinó que, $G_{\text{experimental}}$ (ecuación 2) es menor a G_{tabulado} para cada caso de capsaicinoide, por ende, **las varianzas de los tres niveles de concentración utilizadas son equivalentes, por lo tanto el factor concentración no tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados en la determinación de la exactitud.**

Prueba T-Student: se halló que al ser $t_{\text{experimental}}$ (ecuación 6) menor a t_{tabulado} , **no existen diferencias estadísticas significativas entre el porcentaje de recuperación promedio y el 100% de las concentraciones teóricas, por lo que la exactitud en esta prueba es correcta.**

LDD Y LDC

Los imites de detección y cuantificación son aquellos límites mínimos en el que los capsaicinoides presentes en las muestras se pueden llegar a detectar y cuantificar con razonable certeza bajo las condiciones estandarizadas en el presente método. Es en este parámetro se evaluó la capacidad de detectar, cuantificar, distinguir y discriminar pequeñas trazas de impurezas y diferenciar la señal de respuesta/ruido en medio de una lectura, es decir, poner a prueba la sensibilidad del método. Para encontrar dichos límites se procedió a construir 2 curvas de calibración para cada uno de los dos capsaicinoides en cuestión (Tabla 21 y 22) a niveles de concentración cercanos al límite inferior pactado en el rango de la linealidad (menores a 20ppm, siendo este el límite mayor en la recta). La ecuación 7 se usó para hallar cada límite de detección y cuantificación, tal como se encuentran en la tabla 23. **Se halló que para la Capsaicina el LDD fue de 0,222 ppm, el LDC fue de 0,351 ppm y para la Dihidrocapsaicina el LDD fue de 0,055 ppm, el LDC fue de 0,146 ppm.**

Los **estudios de estabilidad** son realizados con el fin de establecer el período de tiempo en el cual las propiedades de las soluciones preparadas de capsaicinoides se mantienen dentro de sus especificaciones bajo la influencia de una variedad de factores ambientales tales como temperatura, humedad y luz, los demás componentes que componen dicha solución, permitiendo determinar las condiciones de almacenamiento y un período de vida útil. En medio de este proyecto se prescindió de este tipo de análisis, pues se encontraron varios artículos que aseguran una estabilidad relativamente segura que se adapta a la presente validación. Dichos estudios se realizaron debido a que los resultados del tratamiento con capsaicina tusigénica en grupos de pacientes clínicos eran inconsistentes y conflictivos posiblemente por la estabilidad de las soluciones preparadas y almacenadas no evaluadas con anterioridad. El objetivo de ese estudio fue evaluar la estabilidad de las soluciones de capsaicina almacenadas y las concentraciones reales de las soluciones preparadas. Para ello se prepararon soluciones de capsaicina a concentraciones que iban en el rango de 0,5- 128 μM y (0,1527 - 39ppm) y se analizaron usando cromatografía líquida de alto rendimiento. Luego, se almacenaron estas muestras de diferentes concentraciones en 4 tipos condiciones ambientales y se midieron cada dos meses durante 1 año: 4 ° C y protegidas de la luz, soluciones a Temperatura ambiente (25 °C), expuesta a la luz y protegida de la luz y por ultimo a -20 ° C y protegidas de la luz. De este estudio se concluyó que las soluciones de concentración 4 μM (1,22ppm) o superior son estables durante 1 año si se almacenan a 4 °C protegidos de la luz(E., Kopec, DeBellis, & Irwin, 2002).

En la presente validación nunca se realizaron soluciones de Capsaicinoides tan bajas e inestables como las que se evaluó en el artículo anteriormente estudiado; Se construyeron soluciones que estaban en el rango de estabilidad y estuvieron en las condiciones de temperatura y exposición a la luz que sugiere dicha investigación. Aunque estos datos sirvieron para tener referencias en cuanto a los cuidados que se debían tener en medio de la validación, siempre es importante realizar un estudio más exhaustivo que evalúe los parámetros ambientales reales dentro de los laboratorios de investigación de la universidad Icesi donde se preparen y se almacenen estas soluciones.

Pungencia en términos de SHU

La forma correcta de exponer los datos de pungencia de una muestra proveniente del ají es en términos de SHU (Scoville Heat Units). Debido a que en toda la validación se habló de concentraciones de capsaicinoides en términos de ppm, el siguiente análisis orienta y explica la manera adecuada en que se deben presentar los datos de pungencia en futuros reportes. Partiendo del hecho que 1ppm (mg/Kg) de capsaicinoide equivale a 15 SHU, y la concentración hallada en ppm en el método por UHPLC está en términos de mg/L, se tuvo que pasar a términos de mg/Kg, para confrontar con la cantidad de la alícuota y el peso del material seco y molido así como lo indica la siguiente ecuación:

$$SHU_{\text{capsaicina}} = \frac{\frac{15 \text{ SHU}}{1 \text{ ppm } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)} \times \text{Concentracion hallada en ppm} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \\ \times 5 \text{ ml de etanol(alicuota)}$$

$$SHU_{\text{capsaicinoide}} = \frac{\text{Concentracion hallada en ppm} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times 75 \text{ SHU}}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

Ecuación 8. Conversión de ppm a SHU para cada capsaicinoide

$$SHU = SHU_{\text{Capsaicina}} + SHU_{\text{Dihidrocapsaicina}}$$

Ecuación 9. SHU total en la muestra.

5. CONCLUSIONES

Se validó el método desarrollado y estandarizado en el semillero de productos naturales para la determinación de la pungencia en productos derivados del ají en las instalaciones del LIQ (Laboratorio de Instrumentación Química) de la facultad de ciencias naturales de la Universidad ICESI.

Se obtuvieron datos que evaluados estadísticamente comprueban que el método es efectivo a la hora de valorar los capsaicinoides que le dan un grado de pungencia a la pasta de ají, pues produce una respuesta selectiva, lineal, precisa y exacta para los dos capsaicinoides al tiempo (Capsaicina y Dihidrocapsaicina) siempre y cuando el método trabaje bajo las especificaciones y condiciones establecidas, permitiendo llevar a cabo mediciones para conocer la pungencia en muestras de pasta de ají en términos de SHU (Scoville Heat Units).

Se dotó evidencia documentada y procedimientos estándares operativos para ser ejecutados por el LIQ para la cuantificación y evaluación de la pungencia en la pasta de ají.

6. RECOMENDACIONES

Se sugiere tener especial cuidado con la manipulación de las micropipetas que se van a emplear a la hora de construir la curva de calibración, pues el hecho de no tomar bien un volumen destinado a construir una alícuota puede llevar a cambios significativos en los datos obtenidos y que los %RSD sobrepasen el 2,68%, pues este es el valor máximo aceptado. Con ayuda de micropipetas que tengan una consigna de calibración reciente, se logran resultados mucho más eficientes y precisos.

Tener precaución con la manipulación de los solventes y tener claro su origen, pues pueden estar contaminados y llegar a generar apariciones de bandas incongruentes que afecten el resultado de la muestra. Las muestras estándares de referencias y las soluciones preparadas a almacenar deben estar en refrigeración a 4°C y sin contacto directo a la luz, según lo ha sugerido diferentes estudios consignados bibliográficamente.

Hay que tener en cuenta que para evaluar muestras, los viales deben estar lo más limpios posibles, los reactivos los más nuevos posibles, instrumentos volumétricos calibrados e instrumentos analíticos calificados, para garantizar así que factores externos fuera de las especificaciones no van a afectar la respuesta en cada análisis.

También se aconseja estar pendiente que la temperatura de la columna y el flujo de gradiente en el equipo, pues la variación de estos pueden llegar a cambiar los tiempos de retención e incluso la resolución para cada banda cromatográfica de cada capsaicinoide y generar un falso positivo, pues no se sabe a qué grado o en que rango se puede cambiar la temperatura y flujo sin que se afecte la idoneidad del método, para saberlo hizo falta un estudio de Robustez, el cual se recomienda anexar en un futuro addendum en la presente validación.

Por último, se recomienda a futuros ensayos cuando se realice una revalidación del método, además de adicionar los estudios de robustez, que se realicen ensayos de estabilidad y degradación que se sometan a las condiciones y factores ambientales dentro de los laboratorios del LIQ, y así darnos una idea de la estabilidad de nuestras muestras. También que se tengan en cuenta ensayos de comparación con otro método vigente, como por ejemplo confrontarlo con el método 995.03 de la AOAC.

7. REFERENCIAS

- AEFI. (2001). Validación de metodos análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. *Asociación Española de farmacéuticos en la industria.*, 17-86.
- AOAC Official Method 995.03. (1995). *Capsaicinoids in Capsicums and Their Extractives Liquid Chromatographic Method.*
- Bajer, T. P. (2010). Central composite design of pressurised hot water extraction process for extracting capsaicinoids from chili peppers. . *Journal of Food Composition and Analysis*, , 32-38.
- Barbero, G., Ruiz, A., Liazid, A., Palma, M., Vera, J., & C.G., B. (2014). Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annum* L.). *Food Chemistry*, 200–206.
- Betts, T. (2008). Pungency Quantitation of Hot Pepper Sauces Using HPLC. *Journal of Chemical Education*, 1.
- Bosland, P. W., & Votava, E. J. (2012). Peppers. Vegetable and Spice. En P. W. Bosland, & E. J. Votava, *Peppers. Vegetable and Spice*. Cambridge, UK: CABI.
- Caterina, M., Leffler, A., Malmberg, A., Marti, W., Trafton, J., & Petersen-Zeitz, K. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice. *Science*, 306–313.
- Conway, S. (2008). TRPping the switch on pain: an introduction to the chemistry and biology of capsaicin and TRPV1. *Chem. Soc*, 1530-1545.
- Denga, Y., Huang, X., Wua, H., Zhao, M., Lua, Q., Israelib, E., . . . Shoenfeldb, Y. (2016). Some like it hot: The emerging role of spicy food (capsaicin) in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 451–456.
- DeWitt, D., & Bosland, P. (1993). The Pepper Garden. *Ten Speed Press: Berkeley*.
- E., S., Kopec, S., DeBellis, R., & Irwin, R. (2002). Chemical Analysis of Freshly Prepared and Stored Capsaicin Solutions: Implications for Tussigenic Challenges. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 529-534.
- Estrada, B., Diaz, J., Merino, F., & Bernal, M. (1999). The effect of seasonal changes on the pungency. *Capsicum Eggplant News*, 28-31.
- Fountain, K. (2011). UPLC versus UHPLC: Comparison of Loading and Peak Capacity for Small Molecule Drugs. *Waters the science of what's possible*, 1-6.

- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 2. Cromatografía: principios generales. *Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química*, 2.8.
- Gonzalez-Zamora, A., Sierra-Campos, E., Luna-Ortega, J. G., Perez-Morales, R., Rodriguez-Ortiz, J., & Garcia-Hernandez, J. (2013). Characterization of different capsicum varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature. *Molecules*, 13471–13486.
- Guinness World Records. (2013). *Hottest chili*. Reino Unido: HIT Entertainment.
- Harvell, K., & Bosland, P. (1997). Harvell, K.; Bosland, P.W. *HortScience*, 1292.
- ICH. (1996). ICHQ2B: Validation of Analytical: Methodology. *Guidance for Industry. ICHQ2B: Validation of Analytical: Methodology.*, 1-10.
- Martínez, A. (2008). Análisis de agro negocios alianza productiva y comercial Ají. . *Ministerio de agricultura y Desarrollo rural.*, 4,5.
- Martinez, G. (2008.). Análisis de agro negocios alianza productiva y comercial Ají. *ministerio de agricultura y desarrollo rural.*, 11.
- Mathur, R., Dangi, R., Dass, S., & Malhotra, R. (2000). The hottest chilli variety in India. *Current Science*, 287-288.
- Meckelmann, S., Riegel, D., M.J., V.-Z., Ríos, L., Peña, K., Ugas, R., . . . Petz, M. (2013). Compositional Characterization of Native Peruvian Chili Peppers. *Agricultural and Food Chemistry.*, 2531.
- Minagricultura. (15 de Julio de 2014). Ají tabasco, exportación de paz. *Noticias*, pág. 1.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., . . . Zeidler, J. A. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 986 - 988.
- Programa de Transformación Productiva (PTP). (2013). *Elaboración y acompañamiento del Plan de Negocios para el Sector Hortofrutícola en Colombia. FASE IV. Plan de Negocio Ají*. Colombia: PTP.
- Rouessac, F., & Rouessac, A. (2003). Cromatografía líquida de alta eficacia. En F. Rouessac, & A. Rouessac, *Análisis Químico, Métodos y técnicas instrumentales modernas* (págs. 57-59). España: Mc Graw Hill.
- Sembramos. (2013). AJÍ COLOMBIANO: Grandes oportunidades de mercado. *SEMBRAMOS*, 7.
- Sukrasno, N., & Yeoman, M. (1993). Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry*, 839-844.

- United States Pharmacopeial Convention 39 & National Formulary 34. (2016). <1225> VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES. En U. S. Convention, *U.S. Pharmacopeia & National Formulary* (pág. 1). United States Pharmacopeial Convention, Incorporated.
- Usman, M., Rafii, M., Ismail, M., Malek, M., & Latif, M. (2014). Capsaicin and Dihydrocapsaicin Determination in Chili Pepper Genotypes Using Ultra-Fast Liquid Chromatography. *Molecules.*, 6474-6488.
- Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). (2005). *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. ICH Harmonised tripartite guideline.
- Walsh, B. M., & Hoot, S. B. (2001.). Phylogenetic relationships of Capsicum. *Plant Sci.*, 1409-1418.

8. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de validación de una metodología por medio de UHPLC para la determinación de pungencia de pasta de ají

	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR MEDIO DE UHPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE PUNGENCIA DE PASTA DE AJÍ	NUMERO: PVM-PN-02
		FECHA DE EMISIÓN: 15 – JUL – 16.

REALIZADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
NOMBRE: Jonathan Guauque Medina.	NOMBRE: Guillermo León Montoya.
FIRMA:	FIRMA:
CARGO: Estudiante de Química Farmacéutica	CARGO: Director de proyecto de grado
FECHA:	FECHA:

1. Objetivo

1.1 Validar una metodología analítica de cromatografía líquida UHPLC para la cuantificación total de capsaicinoides proveniente de diferentes tipos de ají (Cayena, Tabasco, Habanero).

2. Alcance

2.1 Este procedimiento está dirigido hacia el sector hortofrutícola de la región, al personal administrativo y operativo del Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ) y a los programas académicos de los laboratorios de Productos Naturales y Análisis Instrumental.

3. Antecedentes

El sector hortofrutícola del ají de Colombia se encuentra en una posición muy interesante de desarrollo, ya que cuenta con requisitos agrológicos y ambientales muy favorables, los cuales permiten generar las condiciones para obtener cosechas a lo largo de todo el año. El área cosechada de Ají en Colombia en el año 2011 fue de 2.045 hectáreas, sectorizada en los departamentos de Magdalena y Bolívar, Valle del Cauca, La Guajira y Córdoba. Para la región vallecaucana, en los últimos años la exportación de pasta de ají ha dado excelentes resultados tanto de calidad como de productividad, por esta razón principalmente se necesita de una metodología idónea capaz de generar reportes que evidencian la calidad de los productos a exportar. En el ají, se

encuentran diferentes moléculas activas que le proveen su valor de pungencia correspondiente, entre ellas están los capsaicinoides principales capsaicina y dihidrocapsaicina (que representan alrededor del 77-98% del contenido total de capsaicinoides) y otros capsaicinoides en menores cantidades, (Barbero, et al., 2014).

La metodología analítica de UHPLC es la técnica analítica de separación y de detección que se usara para realizar la presente validación. El éxito de esta técnica se debe a la posibilidad de actuar de forma muy selectiva entre compuestos de primordial interés.

4. Responsabilidad y autoridad

4.1 Personal administrativo y operativo a cargo del Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ)

4.2 Profesores a cargo del Laboratorio de Productos Naturales y análisis instrumental.

5. Definiciones

5.1. *Calibración*: Comparar valores que indican un instrumento determinado con valores de referencia ya establecidos.

5.2. *Capsaicinoides*: Familia de principios activos en el Ají con capacidad de generar pungencia.

5.3. *Criterio de Aceptación*: Límites específicos para las características de un producto, proceso o servicio definidos en los requisitos de un programa de calidad.

5.4. *Exactitud*: Es la proximidad entre los resultados obtenidos con el procedimiento analítico establecido y el valor verdadero.

5.5 *Intervalo*: Amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito.

5.6. *Límite de cuantificación*: es la cantidad más baja de analito presente en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas para un método analítico.

5.7. *Límite de detección*: Cantidad mínima de analito presente en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente como un valor exacto, para un método analítico específico.

5.8. *Linealidad*: Es la capacidad de un procedimiento analítico para obtener resultados proporcionales entre la concentración del analito y su respuesta al aplicar el método.

5.9. *Método Analítico*: Detalla los pasos necesarios para realizar un análisis de un método adecuado para el uso específico.

5.10. *Placebo*: Muestra a estudiar sin principios activos.

5.11. *Placebo enriquecido*: Muestra a la que se le ha adicionado el principio activo para su posterior estudio.

5.12. *Precisión*: Expresa el grado de concordancia o dispersión entre una serie de medidas múltiples tomadas a partir de unas mismas muestras homogéneas bajo las mismas condiciones prescritas.

5.13. *Reproducibilidad*: Evalúa la precisión entre laboratorios diferentes.

5.14. *Selectividad*: es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.

5.15. *Validación*: Evidencia documentada que provee un alto grado de seguridad en que un proceso específico producirá en forma consistente, un producto con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

6. Parámetros a evaluar durante la validación

0.1. **Selectividad**: Capacidad de evaluar de manera inequívoca los capsaicinoides de interés (capsaicina y dihidrocapsaicina) en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz de la muestra vegetal o la pasta de ají.

0.2. **Linealidad**: Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentraciones de los capsaicinoides a evaluar dentro de un rango establecido.

0.3. **Precisión**: Expresa la concordancia entre una serie de medidas obtenidas con el método de cuantificación de capsaicinoides por medio de UHPLC, de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas. Se evaluarán dos parámetros para desarrollar este punto:

0.3.1. **Repetibilidad**: Evaluará la precisión intraensayo del método con los siguientes ítems:

0.3.1.1. **Repetibilidad del sistema instrumental**: Este parámetro evalúa únicamente al instrumento en medio del método en este caso el UHPLC, y se determina analizando repetidamente una misma muestra homogénea con una concentración establecida como nominal que se construirá con ayuda de estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina de forma consecutiva de 6 a 10 veces.

0.3.1.2. **Repetibilidad del método:** A diferencia del ensayo anterior, en este caso se parte de alícuotas de una misma muestra homogénea y se les realiza todo el procedimiento indicado de forma individual, se analizan de forma independiente como si fueran réplicas de una misma muestra y con un mismo analista. Tal como lo propone la ICHQ1R2 se recomiendan mínimo 9 mediciones para un total 3 niveles de concentración (3 mediciones por nivel). La repetibilidad del método debe ser mayor a la repetibilidad del instrumento, su relación teórica está dada por la ecuación propuesta por Carporal-Gautier

0.3.2. **Precisión intermedia:** Evalúa la precisión del método frente a variaciones de analistas a diferentes días de evaluación.

0.4. **Exactitud:** Proximidad entre los datos o resultados experimentalmente hallados y un valor verdadero o aceptado como valor de referencia.

0.5. **Límite de detección:** Cantidad mínima de los analitos (capsaicinoides) presentes en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente como un valor exacto, para un método analítico por UHPLC.

0.6. **Límite de cuantificación:** es la cantidad más baja de los analitos presentes en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas para el método analítico por UHPLC.

7. Materiales y equipos

7.1 Elementos de higiene y seguridad personal.

Usar durante todo el desarrollo del proceso experimental los siguientes elementos:

- Bata de laboratorio antifluido.
- Pantalón largo.
- Guantes limpios de nitrilo.
- Tapa Bocas.
- Gafas de seguridad.
- Zapatos cerrados de suela antideslizante.

7.2 Equipos

Equipos	Cantidad
UHPLC Hitachi Lachrom Elite	1
Columna ZORBAX Eclipse Plus C18 de Agilent, 100 x 3,0 mm; 3,5 µm	1
Balanza analítica	1
Ultrasonido	1
Shaker	1

7.3 Materiales

Materiales	Cantidad
Tubo de ensayo de tapa rosca	35
Tubo de ensayo	35
Vial ámbar para HPLC	300
Gradilla para Viales HPLC	1
Micropipeta 1 -10 μ L	1
Punta blanca para micropipeta	35
Jeringa de 5 cc	35
Filtro jeringa con poro de 0,2 μ m	35
Cámara de vacío para cartuchos	1
Cartucho Phenomenex	35
Bomba de vacío	1
Micropipeta 20 -200 μ L	1
Micropipeta 100 -1000 μ L	1
Punta amarilla para micropipeta	35
Punta azul para micropipeta	35

7.4 Reactivos.

Reactivos	Cantidad
Metanol ultrapuro grado cromatográfico	8 L
Agua tipo 1	15 L
Ácido Fórmico	15 mL
Estándar de Capsaicina	50 mg
Estándar de Dihidrocapsaicina	50 mg

7.5 Material Vegetal.

Material Vegetal	Cantidad
Pimentón Rojo	1,5 g
Cayenne	5,0 g
Tabasco	5,0 g
Pasta de ají	5,0 g

8. Descripción del proceso

Por medio del presente procedimiento se evaluarán los siguientes parámetros: selectividad, exactitud, precisión, linealidad del método, linealidad del sistema y límites de detección y cuantificación para llevar a cabo la validación de la metodología de análisis de capsaicinoides presentes en la pasta de ají.

9. Procedimiento

9.1 Extracción de la muestra

9.1.1 Pesar en la balanza analítica 500 mg de la muestra seca y triturada empleando mortero y pistilo.

9.1.2 Adicionar el material pesado en un tubo de ensayo mediano con tapa rosca.

9.1.3 Agregar 5 mL de Metanol ultrapuro de grado cromatográfico y ponerlo en agitación con ayuda del vortex por 60s.

9.1.4 Asistir el proceso de extracción con ultrasonido por 15 min a 50 °C y luego poner el tubo de ensayo de nuevo en el vortex por 60 s.

9.1.5 Filtrar la muestra con ayuda de un embudo de vidrio, el cual contiene una mota de algodón como elemento filtrante. Colectar el filtrado en otro tubo de ensayo.

9.1.6 Instalar un cartucho Phenomenex en la cámara de vacío y adicionar 1 mL de metanol ultrapuro en dicho cartucho, prender la bomba, dejar correr el metanol y desecharlo.

9.1.7 Instalar un tubo de ensayo dentro de la cámara justo debajo del cartucho. En este cartucho adicionar 3 mL de la muestra colectada en el punto 9.1.5, prender el vacío para correr la muestra y colectarla en el tubo de ensayo.

9.1.8 En una jeringa de 5 cc llenar 2 mL de la muestra colectada, instalar un filtro de jeringa de 2 µm y colectar 1mL de la solución ya filtrada a un vial de cromatografía.

9.2 Preparación de la curva de calibración.

9.2.1 En la balanza analítica de 6 cifras significativas, pesar 2,11 mg de estándar de Capsaicina y 2,22 mg de estándar de Dihidrocapsaicina independientemente en dos papeles pesa muestras para cada estándar.

9.2.2 Con ayuda de una espátula, transferir totalmente las dos muestras pesadas a un matraz de 5 mL.

9.2.3 Adicionar al matraz 5 mL de Metanol grado cromatográfico hasta aforar, tapar el matraz y homogenizar cuidadosamente. **Esta será la solución estándar de 400 ppm de capsaicinoides** (Capsaicina y Dihidrocapsaicina)

9.2.4 En un matraces de 5 mL realizar las diluciones de 400, 160, 80, 40 y 20 ppm a partir de la solución estándar de 400 ppm tomando los volúmenes sugeridos en la siguiente tabla para cada nivel de concentración:

Nivel	Concentración (ppm)	Volumen de solución STD (μ L)
1	400	
2	160	2000
3	80	1000
4	40	500
5	20	250

Para el nivel 1 de 400 ppm se toman 200 μ L directamente de la solución estándar a un vial de cromatografía (este proceso se realiza por triplicado gastando de esta manera de la solución estándar 600 μ L). Para el resto de niveles de calibración se usan matraces de 5 mL, adicionando lo indicado en la tabla anterior y enrazando con metanol ultrapuro de grado cromatográfico.

9.2.5 Por ultimo, las muestras elaboradas en los matraces se filtran, y se adiciona 1 mL en los viales de cromatografía. Este paso se debe hacer por triplicado para cada nivel de calibración.

9.3 Preparación del placebo enriquecido.

9.3.1 Realizar por duplicado el punto 9.1 hasta el literal 9.1.8 usando como muestra un pimentón seco y molido para obtener un volumen total de 6 mL (3mL por cada muestra). **Esta será la muestra placebo.**

9.3.2 En la balanza analítica de 6 cifras significativas, pesar 1,05 mg de estándar de Capsaicina y 1,11 mg de estándar de Dihidrocapsaicina independientemente en dos papeles pesa muestras para cada estándar y obtener una solución de concentración nominal de 250 ppm.

9.3.3 Con ayuda de una espátula, transferir totalmente las dos muestras pesadas a un matraz de 5 mL, enrasar a 5 mL de placebo obtenido en el literal 9.3.1 y homogenizar.

Esta será la solución de placebo enriquecido con los dos capsaicinoides que servirá más adelante para realizar la selectividad y especificidad de la validación.

9.4 Preparación de solventes para el análisis en el UHPLC.

9.4.1. Adicionar 1 L de agua tipo 1 y 1 mL de ácido fórmico en un vaso schott de tapa azul de 1,2L. Este será el solvente A.

9.4.2. En un vaso schott de tapa azul de 700 mL, adicionar 500 mL de metanol. Este será el solvente B.

9.4.3 Instalar cada solvente en los dispensadores del UHPLC.

9.5 Parámetros cromatográficos.

Parámetro	Valor
Fase estacionaria	Columna ZORBAX Eclipse Plus C18 de Agilent, 100 x 3,0 mm, con un tamaño de partícula de 3,5 µm
Fase móvil	Solvente A Agua tipo 1 miliQ (0,55 µS/cm ³) y Ac. Fórmico 1% (v/v). Solvente B Metanol de grado HPLC
Flujo	0,5 mL/min en gradiente.
Gradiente	0-10 min (30%-70% solvente B), 10-15 min (70%-30% solvente B); respectivamente la cantidad opuesta para el solvente A.
Detección	DAD-CH-1 a 280 nm.
Estándar de comparación	Capsaicina y Dihidrocapsaicina
Temperatura de columna.	25°C

9.6 Parámetros de validación

9.6.1 Selectividad:

9.6.1.1 Tomar 0,5 mL de la solución de placebo enriquecidos (literal 9.3) y adicionar a un vial de HPLC. Repetir este paso 10 veces.

9.6.1.2 Adicionar a un matraz de 5 mL, 2,50 mL de la solución estándar construida en el literal 9.2.3. Y completar a 5 mL con metanol ultrapuro de grado cromatográfico. Esta será una muestra nominal estándar de 250 ppm.

9.6.1.3 Tomar 0,5 mL de la solución elaborada anteriormente en un vial de HPLC. Repetir este paso 8 veces.

9.6.1.4 Leer las muestra construidas en los anteriores literales por medio del método analítico cromatográfico a validar.

9.6.1.5 Por medio del software y el DAD (Detector de Arreglo de Diodos) se evaluará la coelución de analitos que pueden estar en los mismos picos para capsaicinoide a evaluar, lo que dará una idea de la homogeneidad y pureza para cada pico.

9.6.2 Linealidad:

9.6.2.1. Construir una curva de calibración como lo explica el literal 9.2.

9.6.2.2. Seguir los lineamientos de los puntos 9.4 y 9.5 hasta obtener la lectura de la curva de calibración con ayuda del método analítico en el UHPL y el software Elite LaChrom.

9.6.3 Precisión:

9.6.3.1 Repetibilidad;

9.6.3.1.1. Repetibilidad del sistema instrumental:

9.6.3.1.1.1. Realizar los pasos de los literales 9.6.1.2. y 9.6.1.3

9.6.3.1.1.3. Leer las diez muestras construidas en el anterior literal por medio del método analítico cromatográfico a validar.

9.6.3.1.1.4. Calcular el %RSD con ayuda de las áreas para cada capsaicinoide encontradas en este punto.

9.6.3.1.2. Repetibilidad del método:

9.6.3.1.2.1. Construir una curva de calibración como lo explica el literal 9.2.

9.6.3.1.2.2. Realizar las soluciones de 360, 200 y 60 de la siguiente manera: Tomar de la solución de 400 ppm (literal 9.2.3) los siguientes volúmenes 4500, 2500 y 375 μL respectivamente para cada concentración y adicionarlos en un matraz de 5 mL. Enrazar a 5 mL a cada una de las diluciones con metanol ultrapuro de grado cromatográfico y homogenizar. Filtrar y adicionar 1 mL de cada solución a diferentes viales de cromatografía. Cada concentración debe hacerse por triplicado.

9.6.3.1.2.3. Leer la curva y las nueve muestras construidas (3 réplicas por concentración) en el anterior literal por medio del método analítico cromatográfico a validar.

9.6.3.1.2.4. Repetir todo este punto al día tres y cinco (siendo el día uno la primera vez que se realiza este literal) iniciando el análisis desde cero.

9.6.3.2. Precisión intermedia:

9.6.3.2.1. Repetir el mismo experimento realizado en la *Repetibilidad del método* (literal 9.6.3.1.2.) pero realizándolo un análisis matricial con dos analistas de la siguiente manera:

Analista X	Día 1	Día 2
Analista Y	Día 1	Día 2

9.6.4 Exactitud: Se analiza con los mismos datos obtenidos en la *Reproducibilidad del método* (literal 9.6.3.1.2.) y se calcula por medio del porcentaje de recuperación como herramienta para emplear los criterios estadísticos de $G_{\text{Experimental}}$ y $T_{\text{Experimental}}$.

9.6.5 Limite detección y cuantificación:

9.6.5.1 Preparar una curva de calibración de tres niveles (20, 10 y 4 ppm) de la siguiente manera: A partir de la solución estándar de 400 ppm (literal 9.2.3), transferir a 3 matraces de 5 mL diferentes 250, 125 y 50 μ L respectivamente para cada nivel de calibración, enrasar con metanol ultrapuro de grado cromatográfico y homogenizar.

9.6.5.2 Filtrar y transferir 1 mL de cada concentración a diferentes matraces realizando un triplicado por nivel.

9.6.5.4 Leer las 9 muestras construidas anteriores por medio del método analítico cromatográfico a validar y elaborar una curva de calibración con los datos ya procesados.

9.6.5.5 Calcular la desviación estándar (SD) por cada nivel y realizar una regresión lineal que aproxime la relación entre las desviaciones estándares con respecto a las concentraciones de cada nivel.

10. Evaluación de los datos

10.1 Para realizar una regresión lineal se hará uso de la ecuación de la recta la cual permitirá la obtención de concentraciones desconocidas de capsaicinoides.

$$Y = mX + b$$

Ec1. Ecuación de la recta

Cabe aclarar, que en medio del método se encuentran dos curvas de calibración intrínsecas para cada capsaicinoide evaluado por separado (capsaicina y dihidrocapsaicina)

$$Y_C = mX_C + b$$

➤ Curva de calibración para la Capsaicina.

$$Y_D = mX_D + b$$

➤ Curva de calibración para la Dihidrocapsaicina.

X: Valor del Capsaicinoide en ppm.

Y: áreas bajo la curva para cada capsaicinoide.

m: pendiente de cada recta para cada capsaicinoide.

b: intercepto con el eje y

- La fórmula para la obtención de la concentración en ppm de cada capsaicinoide es:

$$X = \frac{Y-b}{m} \quad \text{Ec 2. Cantidad del capsaicinoide en ppm a evaluar.}$$

10.2 Para la evaluación de la selectividad se usará de la siguiente ecuación:

$$\%D = \frac{D_i - D_s}{D_s} \times 100\% \quad \text{Ec 3. \% de Discrepancia.}$$

D_i = Respuesta media con interferencia; D_s = Respuesta media sin interferencia

10.2 Para la evaluación de la Repetibilidad (*repetibilidad del sistema instrumental y del método*) y Precisión intermedia del método se usará la siguiente ecuación:

$$CV\% = \frac{\text{Desviacion Est.}}{\text{Promedio}} \times 100\% \quad \text{Ec 4. Coeficiente de variación}$$

10.3 Para la evaluación de la exactitud en la validación se usarán las siguientes ecuaciones:

$$(R)\% = \frac{\text{Valor medio hallado}}{\text{Valor aceptado como verdadero}} \times 100\% \quad \text{Ec 5. \% de recuperación}$$

10.4 Para la evaluación del LDD y LDC se usarán la siguiente ecuación:

$$C_l = \frac{Y_{bl} + (K \times S_b)}{b \times \sqrt{n}}$$

Ec 6. Calculo para el LDD y LDC

C_l = Concentración en el límite de detección o cuantificación.

Y_b = Intercepto de la recta en la recta de LDD y LDC.

K = Constante (3 para el LD y 10 para el LC).

S_b = Intercepto de la recta Desviación estándar vs Concentración.

b = Intercepto fijado en la linealidad del método.

n = Número de muestras.

11. Criterios de aceptación

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante los ensayos realizados, se tiene en cuenta los siguientes criterios de aceptación.

PARÁMETRO EVALUADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
SELECTIVIDAD	<p>% DE DISCREPANCIA: La diferencia de los resultados del placebo enriquecido o solo no puede superar al 2%.</p> <p>ACEPTO SÍ: Los resultados de los criterios de aceptación son selectivos, entonces el método ensayado es selectivo para la cuantificación exacta y precisa de producto mostrando capacidad de discriminación suficiente del producto con respecto a interferencias que pudiesen aparecer en la matriz.</p> <p>RECHAZO SÍ: los resultados no son selectivos entonces, el método no es selectivo y no garantiza la cuantificación exacta y precisa del analito mostrando incapacidad de discriminación del analito respecto a interferencias que pudiesen estar en la matriz.</p>
LINEALIDAD	<p>Los resultados se evalúan mediante un análisis de regresión lineal, además de aplicar la prueba t de Student para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación.</p> <p>- De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA):</p> <p><u>PRUEBA PARA LA REGRESIÓN</u> H_0: % de valoración y área no se relacionan linealmente. H_1: % de valoración y área se relacionan linealmente. Si $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$, se rechaza H_0 y existe relación lineal entre las variables.</p> <p><u>INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE</u> H_0: $b=0$ H_1: b diferente de cero. Si $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$, se Rechaza H_0 entonces la pendiente no toma valores de cero y el método responde a los cambios de concentración.</p> <p><u>INTERVALOS DE CONFIANZA PARA EL INTERCEPTO</u> H_0: El intercepto no incluye el cero. H_1: El intercepto incluye el cero. Si $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$, se Rechaza H_0 entonces el intercepto incluye cero y el método es proporcional.</p>

PRECISIÓN	REPETIBILIDAD	REPETIBILIDAD INSTRUMENTAL	La <i>Repetibilidad del sistema instrumental</i> se acepta como precisa, si el %RSD es menor a 2%
		REPETIBILIDAD DEL METODO	<ul style="list-style-type: none"> • Para la <i>Repetibilidad del método</i> se toma el %RSD hallado experimentalmente y se acepta como precisa si este es menor a 1,34% • Se deben calcular e introducir los intervalos de confianza individualmente para cada nivel de concentración.
	PRECISIÓN INTERMEDIA	La <i>Precisión intermedia</i> se acepta como precisa, cuando se evalúa independientemente cada respuesta de cada experimento y estas no superan un %RSD de 2,68%.	
EXACTITUD	<ul style="list-style-type: none"> • Si $G_{Exp} < G_{Tab}$ las varianzas de las tres concentraciones utilizadas (60, 200, 360 ppm) son equivalentes y no influyen en la variabilidad de los resultados • Si $T_{Exp} < T_{Tab}$, No existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% de las concentraciones teóricas añadidas al placebo enriquecido. <p>El método es exacto si Los anteriores puntos cumplen las especificaciones.</p>		
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCION	Se estableció un límite de detección y de cuantificación preciso por medio del método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.		

12. Referencias

- Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI). (2001). Validación de métodos de análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. En *Validación de métodos analíticos* (págs. 17-86). España: AEFI.
- AOAC Official Method 995.03. (1995). *Capsaicinoids in Capsicums and Their Extractives Liquid Chromatographic Method*.
- Barbero, G., Ruiz, A., Liazid, A., Palma, M., Vera, J., & C.G., B. (2014). Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annum* L.). *Food Chemistry*, 200–206.

Anexo 2. Valores de % RSD orientativos del número de réplicas en función de la repetibilidad del método (AEFI, 2001).

Intervalo de aceptación (%)	RSD (%) máximo aceptable				
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
99,0 - 101,0	0,39	0,55	0,67	0,78	0,87
98,5 - 101,5	0,58	0,82	1,01	1,16	1,3
98,0 - 102,0	0,78	1,1	1,34	1,55	1,73
95,0 - 105,0	1,94	2,74	3,36	3,88	4,33
90,0 - 110,0	3,88	5,48	6,71	7,75	8,67
85,5 - 115,0	5,81	8,22	10,07	11,63	13

Anexo3. Curvas de calibración de capsaicina y dihidrocapsaicina usadas en el parámetro de repetibilidad intermedia.

DIA 1: Analista #1

Tabla 1. Curva de calibración de capsaicina en la repetibilidad intermedia.

CURVA CAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3943956	1617334	747223	390898	206514
2	3976170	1591552	769764	411776	211297
3	4025348	1555334	782767	384035	202748
Promedio	3981825	1588073	766585	395570	206853
Des Est	40989,58	31146,04054	17984,02	14448,5	4284,57
%RSD	1,029417	1,961246996	2,345993	3,65258	2,071312
M	9965,224				
B	-7350,25				
R ²	0,999917				

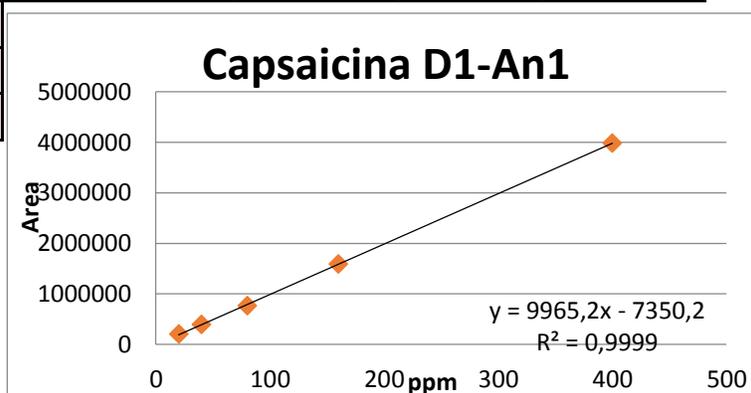


Gráfico1. Curva de calibración de la capsaicina

Tabla 2. Curva de calibración de dihidrocapsaicina en la repetibilidad del intermedia.

CURVA DIHIDROCAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3794067	1540183	719140	392781	193142
2	3834437	1542472	702135	384735	202646
3	3875589	1496239	731673	389301	198997
Promedio	3834698	1526298	717649	388939	198262
Des Est	40761,63	26057,00464	14825,31	4035,197	4794,48
%RSD	1,062968	1,707202961	2,065816	1,037488	2,418259
M	9602,116				
B	-11127				
R ²	0,999759				

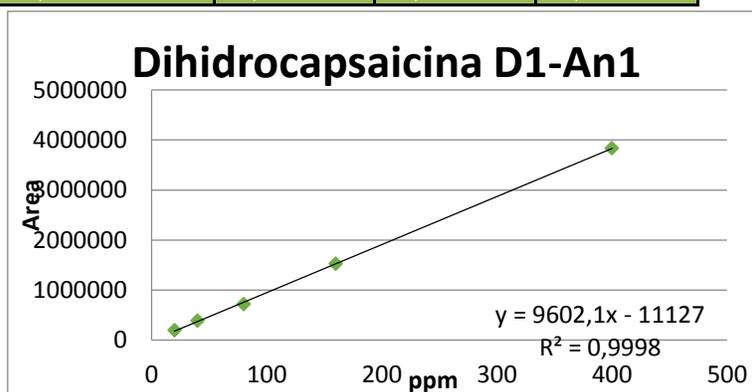


Gráfico 2. Curva de calibración de la dihidrocapsaicina

Analista #2

Tabla 3. Curva de calibración de capsaicina en la repetibilidad intermedia.

CURVA CAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3694586	1512813	716705	326475	177241
2	3778321	1506066	726394	342966	174214
3	3693905	1545931	737326	333299	170454
Promedio	3722271	1521603	726808	334247	173970
Des	48542,21	21336,75	10316,74	8286,243	3400,091
%RSD	1,304102	1,402255	1,419458	2,47908	1,954416
M	9378,26				
B	-17176,6				
R ²	0,999737				

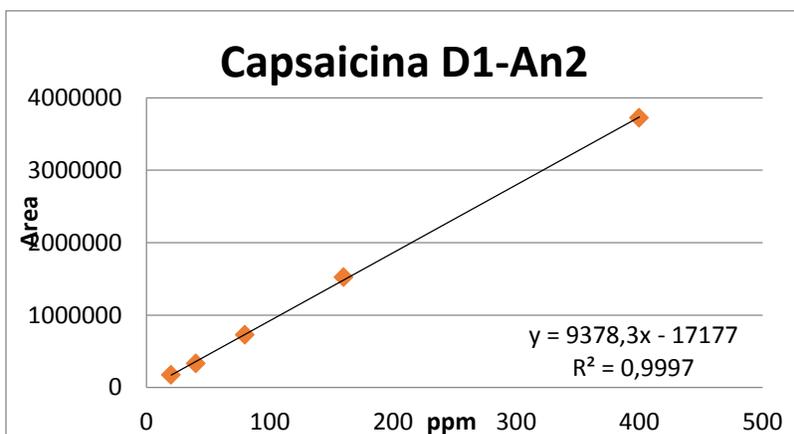


Gráfico 3. Curva de calibración de la capsaicina

Tabla 4. Curva de calibración de dihidrocapsaicina en la repetibilidad del intermedia.

CURVA DIHIDROCAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3694586	1479813	716705	356475	180241
2	3778321	1432066	746394	342966	192414
3	3693905	1472931	737326	363299	186454
Promedio	3722271	1461603	733475	354247	186370
Des Est	48542,21	25810,48	15214,53	10348,03	6086,938
%RSD	1,304102	1,765902	2,074308	2,921138	3,266056
M	9325,26				
B	-13943,3				
R ²	0,999937				

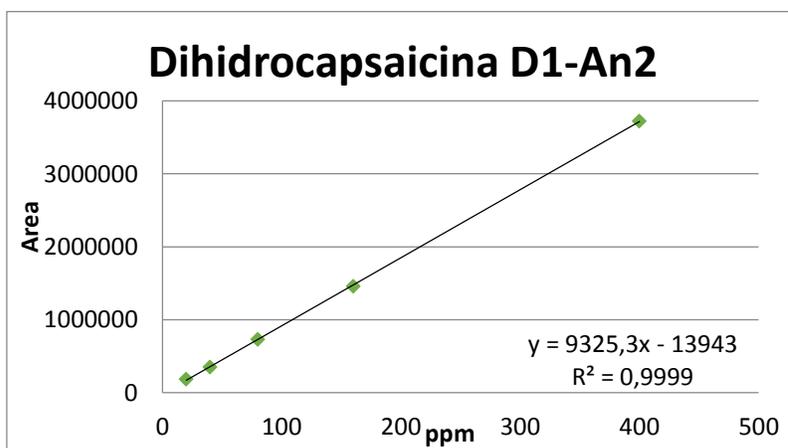


Gráfico 4. Curva de calibración de la dihidrocapsaicina

Día 2

Analista #1

Tabla 5. Curva de calibración de capsaicina en la repetibilidad intermedia.

CURVA CAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3908823	1473762	733762	349121	187271
2	3918289	1481275	751482	364017	183016
3	3885761	1484626	740278	350406	192087
Promedio	3904291	1479888	741841	354515	187458
Des Est	16730,87	5563,285	8962,759	8254,306	4538,39
%RSD	0,428525	0,375926	1,208178	2,32834	2,421017
M	9815,172				
B	-40525,7				
R ²	0,999582				

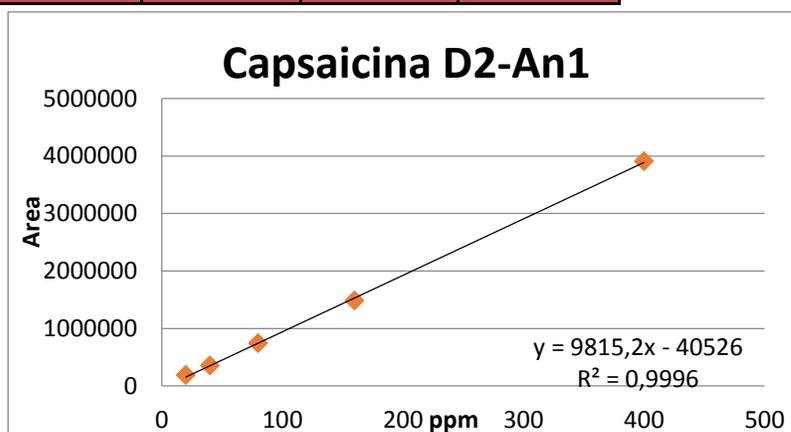


Gráfico 5. Curva de calibración de la capsaicina

Tabla 6. Curva de calibración de dihidrocapsaicina en la repetibilidad del intermedia.

CURVA DIHIDROCAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1		1528551	720430	357852	175000
2	3981883	1515751	733028	368654	167504
3	4018421	1532671	713156	372017	176209
Promedio	4000152	1525658	722205	366174	172904
Des Est	25836,27	8823,272	10054,16	7400,903	4715,731
%RSD	0,645882	0,578326	1,392149	2,021142	2,727364
M	10102,65				
B	-56952,5				
R ²	0,999655				

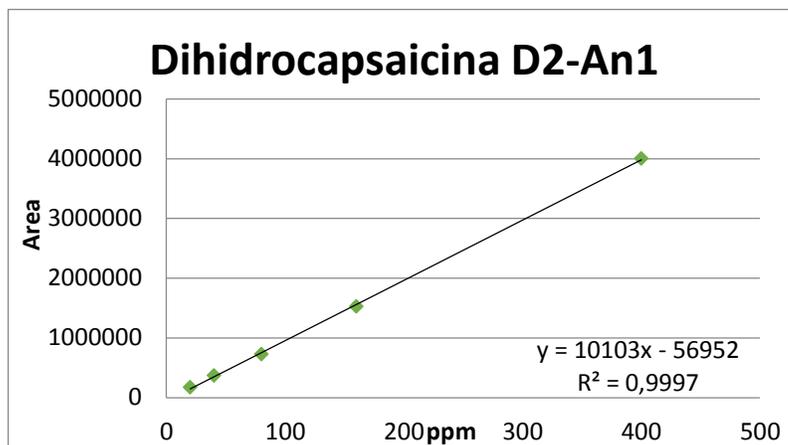


Gráfico 6. Curva de calibración de la dihidrocapsaicina

Analista #2

Tabla 7. Curva de calibración de capsaicina en la repetibilidad intermedia.

CURVA CAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	3939376	1458414	726890	378765	198501
2	3965458	1419731	728245	390814	206888
3	3951982	1420034	755720	387836	202874
Promedio	3952272	1432726	736952	385805	202754
Des Est	13043,42	22246,69	16267,97	6276,012	4194,78
%RSD	0,330023	1,552752	2,207467	1,626732	2,068898
M	9886,637				
B	-42027,3				
R ²	0,99825				

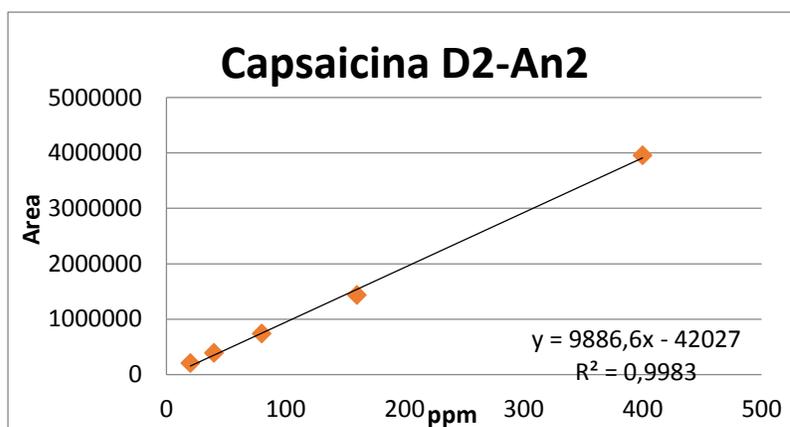


Gráfico 7. Curva de calibración de la capsaicina

Tabla 8. Curva de calibración de dihidrocapsaicina en la repetibilidad del intermedia.

CURVA DIHIDROCAPSAICINA

Repetición	400	160	80	40	20
1	4004042	1502434	736543	395171	187468
2	4025429	1456737	741514	387495	195437
3	3972554	1478230	736653	381524	188334
Promedio	4000675	1479134	738237	388063	190413
Des Est	26597,82	22861,9	2838,787	6841,228	4372,404
%RSD	0,664833	1,545628	0,384536	1,762915	2,296274
M	10039,67				
B	-46249,1				
R ²	0,998944				

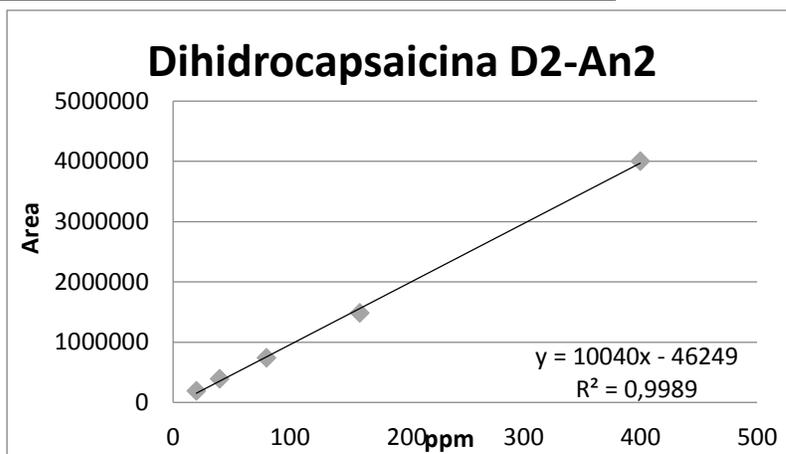


Gráfico 8. Curva de calibración de la dihidrocapsaicina