



**CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO EN GOTAS DE ORTIGA
MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS: desarrollo y validación de
un método analítico para la homogeneización del producto terminado.**

JENNY ANDREA RAMIREZ ALZATE

Informe Practica Empresarial para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Tutor

Juliana Osorio Echavarria

Magister en Ingeniería

Ph.D (c) en Biotecnología

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química

Ingeniería Bioquímica

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2024

Cita	Ramírez Álzate (2024)
Referencia Estilo IEEE (2020)	[1] Ramírez Alzate. J.A, “2024”, <i>Cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga mediante espectrofotometría UV-VIS: desarrollo y validación de un método analítico para la homogeneización del producto terminado</i> . [Práctica Empresarial]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda.

Decano/director: Julio Cesar Saldarriaga.

Jefe departamento: Farlan Taborda Agudelo

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos

Dedicatoria

A Dios, mi familia y todas las personas que de una u otra manera hicieron parte de esta bonita experiencia.

Agradecimientos

Este trabajo es el fruto de un crecimiento personal enriquecido por las personas que me rodean. A mis padres, mi primer y más grande apoyo. A mi pareja, que ha celebrado conmigo cada triunfo. A mis amigos, que han sido mi refugio en los momentos difíciles, y a mis profesores, que han despertado en mí la pasión por el conocimiento. Gracias a todos ellos, he podido alcanzar esta meta.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen estadístico de la prueba de Repetibilidad	23
Tabla 2. ANOVA análisis de varianza estudio R&R.	24
Tabla 3. Datos obtenidos en el ensayo de exactitud y porcentajes de recuperación en ácido clorogénico	25
Tabla 4. Datos obtenidos en el ensayo de exactitud y porcentajes de recuperación en gotas de ortiga	26

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 Gráfico de secuencias o comportamiento de los analistas para los tres niveles de concentración 23

RESUMEN

Laboratorios Medick, empresa dedicada a la fabricación y comercialización de productos a base de sustancias naturales, comprometida con la calidad y el cumplimiento de las normas legales vigentes para el sector farmacéutico en Colombia, tiene como objetivo garantizar que sus productos brinden los beneficios esperados a los consumidores, para lograrlo se planteó evaluar, desarrollar y validar un método para la cuantificación de ácido clorogénico presente en las gotas de ortiga, he implementarlo como técnica analítica. El método se basó en espectrofotometría UV/VIS a 329 nm utilizando como solvente Metanol, el método demostró ser selectivo, lineal, preciso y exacto para la cuantificación del principio activo en el producto terminado. Esta validación es fundamental para el control de calidad y consistencia del producto.

Palabras claves: validación, ácido clorogénico, espectrofotometría uv/vis, gotas de ortiga, fitoterapéuticos.

ABSTRACT

Medick Laboratories, a company dedicated to the manufacturing and commercialization of products based on natural substances, is committed to quality and compliance with current Colombian pharmaceutical regulations. With the aim of ensuring that its products provide the expected benefits to consumers, the company set out to evaluate, develop, and validate a method for the quantification of chlorogenic acid in nettle drops, and to implement it as an analytical technique. The method was based on UV/VIS spectrophotometry at 329 nm using methanol as the solvent. The method demonstrated selectivity, linearity, precision, and accuracy for the quantification of the active ingredient in the finished product. This validation is essential for quality control and product consistency.

Keywords: validation, chlorogenic acid, UV/VIS spectrophotometry, nettle drops, phytotherapeutics."

I. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales como medicina alternativa desempeñan un papel importante en la atención médica, siendo una fuente primordial en los tratamientos de medicina tradicional y complementaria en todo el mundo; se estima que entre el 70% y el 90% de la población rural mundial depende de la herbolaria y la medicina tradicional, incluso en algunos países, estas prácticas están ampliamente integradas en el sistema de salud público [1]. En general, más de 20.000 especies de plantas en el mundo contienen algún compuesto químico aromático; de las cuales se comercializan unas 200 a 250 especies entre medicinales, culinarias e industriales; en Colombia hay un aproximado de 6.000 especies de hierbas aromáticas y medicinales, entre ellas está la ortiga que ha sido utilizada desde tiempos ancestrales en el tratamiento de enfermedades físicas y espirituales en las poblaciones rurales [2] [3]. En la medicina popular, la ortiga se considera un excelente depurativo y diurético, además de ser astringente, hemostático, mineralizante y estimulante del sistema circulatorio. En fitoterapia, se utiliza como drenador hepático-diurético de tipo volumétrico, coadyuvante en el tratamiento de afecciones urinarias de naturaleza inflamatoria y como eliminador de ácido úrico [4]. Para aprovechar sus propiedades, la ortiga se encuentra en diferentes presentaciones como tabletas, cápsulas, cremas y gotas. Las gotas de ortiga son un fitoterapéutico que aprovecha sus propiedades para ponerlas a disposición de las personas. El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) define los fitoterapéuticos como productos medicinales empacados y etiquetados, cuyas sustancias activas provienen de plantas medicinales o asociaciones de éstas o de extractos, tinturas o aceites, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos. Con el fin de facultar a una persona natural o jurídica para producir, comercializar, importar, exportar, envasar, procesar y/o expender este tipo de productos, es necesario que obtenga ante el Invima el registro sanitario en cualquiera de sus categorías tanto para preparaciones farmacéuticas con base en plantas medicinales (PFM) como para productos fitoterapéuticos tradicionales (PFT) y cumplir con las normas establecidas, entre ellas el decreto 1156 de 2018 [5]. Así una de las metas principales de cualquier industria consiste en desarrollar procesos que cumplan con todos los requerimientos preestablecidos por los estamentos y normas reguladoras para obtener productos de calidad, de este modo, se hace necesaria una mejora continua a los procesos involucrados en el

desarrollo de un producto determinado con el fin de garantizar que tanto los procesos como los productos cumplan con las especificaciones y recomendaciones con las que fueron diseñadas; En busca de esta mejora surge el concepto de validación, el cual garantiza que todos aquellos factores que pueden influir en el desarrollo de un producto son controlados para que cada una de las etapas de la producción se realice de forma adecuada y cumpliendo aquellos parámetros de calidad que se han establecido previamente [6][7]. En el caso de las gotas de ortiga es muy importante garantizar la homogeneización y concentración de todos los componentes de la formulación en el proceso de mezclado durante la fabricación del producto, para lograrlo, en este trabajo se busca implementar una técnica analítica validada para la cuantificación de ácido clorogénico principio activo en la ortiga con el fin de garantizar la homogeneización en el proceso de mezclado en el producto fitoterapéutico gotas de ortiga.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las crecientes exigencias regulatorias en la industria farmacéutica y fitoterapéutica imponen desafíos significativos para garantizar la calidad de los productos terminados. Estas regulaciones, diseñadas para proteger la salud del consumidor, demandan la implementación de un método riguroso de control lo suficientemente confiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. El incumplimiento de estos estándares de calidad puede acarrear graves consecuencias legales para las empresas del sector. En Colombia, el Decreto 1156 de 2018 representa un marco regulatorio crucial para el desarrollo y comercialización de productos fitoterapéuticos. Al ser los fitoterapéuticos preparaciones que consisten en una mezcla compleja de uno o más materiales vegetales; su preparación implica cumplir con diferentes requerimientos entre los que se destacan que la materia prima sea de alta calidad, existan buenas prácticas de manufactura (BPM) y exista un control de calidad del producto final, con el fin de garantizar calidad, eficacia y seguridad al consumidor, es así como los laboratorio de análisis deben proporcionar la garantía de resultados de alta calidad, a través del uso de medidas analíticas que sean confiables y adecuadas, las cuales serán evaluadas por entes regulatorios. En el caso de las gotas de ortiga, la matriz compleja y la presencia de múltiples compuestos bioactivos plantean desafíos adicionales para el desarrollo de métodos analíticos confiables. Dado que la homogeneidad de la mezcla es un factor crucial que garantiza la calidad, eficacia y seguridad del producto final, se hace necesario evaluar la mezcla, de este modo los índices de mezclado se convierten en una herramienta que permiten evaluar y cuantificar la distribución espacial de los componentes dentro de la mezcla con valores numéricos que permiten valorar el grado de homogeneidad y se calculan a partir de los datos obtenidos mediante técnicas analíticas validadas. En el proceso de identificar y cuantificar metabolitos en diversos tipos de muestras se encuentran diferentes técnicas analíticas como Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Cromatografía de gases (GC), Espectrometría de masas (MS), espectrofotometría UV/VIS, entre otros. Por lo tanto, se requiere de una técnica y método analítico validado y robusto que permita evaluar de manera precisa y reproducible la homogeneidad de las gotas de ortiga, asegurando el cumplimiento de los requisitos establecidos por el INVIMA y garantizando la calidad y seguridad de este producto fitoterapéutico.

III. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la importancia de los productos fitoterapéuticos en los programas de Atención Primaria en Salud (APS), considerándolos una alternativa significativa para garantizar el derecho a la salud, tanto en la prevención como en el tratamiento y rehabilitación de enfermedades. En la producción de productos fitoterapéuticos, la homogeneidad de la mezcla es un factor crucial que garantiza la calidad, eficacia y seguridad del producto final, es así como los índices de mezclado se convierten en una herramienta que permiten evaluar y cuantificar la distribución espacial de los componentes dentro de una mezcla. Estos índices son esenciales para asegurar la consistencia del producto y el cumplimiento de los estándares de calidad establecidos. En este marco, se propone desarrollar y validar un protocolo analítico para la cuantificación de ácido clorogénico por espectrofotometría UV-VIS. La implementación de este protocolo permitirá asegurar la concentración del metabolito de interés y la homogeneidad de la mezcla en el producto terminado gotas de ortiga garantizando la calidad, eficacia, seguridad, uniformidad de la dosis y la biodisponibilidad de los principios activos del producto final.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Implementar una técnica analítica para la cuantificación de ácido clorogénico en el producto fitoterapéutico gotas de ortiga y garantizar la homogeneización en el proceso de mezclado.

B. Objetivos específicos

- Evaluar un método analítico basado en espectrofotometría UV/VIS adecuado para la cuantificación del ácido clorogénico en gotas de ortiga.
- Desarrollar un método adecuado de cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga para garantizar la homogeneización del producto terminado.
- Validar el método de cuantificación de ácido clorogénico presente en las gotas de ortiga para la implementación como técnica analítica.

V. MARCO TEÓRICO

En el ámbito de productos farmacéuticos, los fitoterapéuticos ocupan un lugar destacado; estos productos, elaborados a partir de diversas partes de plantas como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, madera, corteza, raíces o rizomas ofrecen una alternativa natural para el cuidado de la salud. El término "fitoterapia", acuñado por el médico francés Henri Leclerc a principios del siglo XX, se utiliza para diferenciar el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos de la producción de medicamentos de síntesis química [12].

Desde la época de los griegos, la ortiga ha sido reconocida por sus propiedades medicinales. Los antiguos griegos la empleaban para tratar infecciones, tos, artritis y estimular el crecimiento del cabello; en la actualidad, la ortiga se utiliza principalmente para combatir problemas como uñas frágiles, caída del cabello, acné y fatiga. Las gotas de ortiga tradicionalmente se han utilizado como diurético. La Ortiga (*Urtica dioica*) es una planta herbácea vivaz de hasta un metro de altura, de cepa ramificada con tallo erguido y cuadrangular, hojas ovales opuestas dos a dos dispuestas por todo el tallo, con largo peciolo, acabadas en punta y bordes fuertemente dentados. De las axilas de estas hojas brotan, en la parte superior de los tallos, inflorescencias en forma de panículas. Son flores muy menudas, verde amarillosas con estambres amarillos, las masculinas con cuatro estambres y las femeninas en forma de bolita (el estigma). Sus frutos son aquenios (cápsulas). Toda la planta se cubre de pelillos urticantes, que se abren y al rozar con la piel vierten su contenido sobre la herida que producen, provocando un intenso escozor [10]. La ortiga se destaca por su alto contenido en sales minerales esenciales para el organismo, como el azufre, calcio, hierro, magnesio, manganeso, sílice, potasio y zinc, además de ácidos orgánicos, flavonoides, vitaminas A, B2, C, K 1 y ácido clorogénico, ácido fólico, aminoácidos esenciales y los neurotransmisores acetilcolina, histamina y serotonina, de igual forma, mucílagos, taninos, fitoesteroles, resinas, ácido fórmico, glucoquininas y un alto contenido de clorofila [10]. En el mercado además de la planta se puede encontrar en diversas presentaciones como cremas, tabletas, extractos o gotas para aprovechar todas sus propiedades. En el caso de las gotas su preparación parte de una mezcla compuesta por una solución hidroalcohólica y ortiga en polvo, en este proceso el mezclado es una operación farmacéutica fundamental para conseguir la máxima interposición entre los componentes y lograr una distribución lo más homogénea posible de los mismos.

La validación de procesos es un elemento crucial para garantizar la calidad, consistencia y seguridad de los productos elaborados. Este proceso, tal y como lo define la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1998, consiste en el establecimiento de pruebas documentales que proporcionan un alto grado de certeza de que un proceso planificado se llevará a cabo de manera uniforme y en conformidad con los resultados previstos especificados. Los estudios de validación se llevan a cabo bajo condiciones de pruebas que simulan las condiciones reales que se encontrarán durante el proceso normal, esto permite evaluar el comportamiento del sistema en situaciones límite y confirmar que está bajo control, asegurando la calidad y consistencia de los productos en todo momento. proporcionando la evidencia documental necesaria para demostrar que los procesos se llevan a cabo de manera controlada, consistente y conforme a los estándares de calidad establecidos [13].

La validación de métodos analíticos es un proceso crucial que garantiza la confiabilidad de los resultados obtenidos. Se inicia a partir de un método aprobado y busca demostrar que este, junto a su sistema analítico, producirán resultados precisos y consistentes. La validación se compone de:

- Un protocolo de validación.
- Desarrollo de las pruebas de validación
- Evaluación de los resultados analíticos
- Informe de validación.

Las pruebas de parámetros de validación son el pilar fundamental para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos en análisis químicos. Estas pruebas se componen de una serie de evaluaciones que permiten verificar la eficacia y robustez del método analítico empleado. Los parámetros clave a evaluar incluyen selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia (reproducibilidad) y criterios de aceptación [14].

Selectividad: es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes.

Linealidad: es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica un procedimiento repetidamente sobre una muestra homogénea.

Repetibilidad: Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista y en un mismo día.

Precisión intermedia (reproductividad): Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra, pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, días y aparatos).

Criterios de aceptación: Condición estadística que debe cumplirse para aprobar o rechazar una prueba analítica.

La espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es un tipo de espectroscopia de absorción en la que se ilumina una muestra con rayos electromagnéticos de varias longitudes de onda en el rango ultravioleta (UV) y visible (VIS). Según la sustancia, la muestra absorbe parcialmente los rayos de luz ultravioleta o visible. El resto de la luz, es decir, la luz transmitida, se registra como una función de la longitud de onda mediante un detector adecuado, el detector produce el espectro UV-VIS único de la muestra, conocido como el espectro de absorción. Cuando la luz incide en un objeto, este puede absorberse normalmente porque la longitud de onda de la luz absorbida corresponde a una excitación electrónica en el objeto. El resto de la luz se transmite, es decir, atraviesa el objeto. En un espectrofotómetro, la transmitancia se mide dividiendo el espectro de intensidad de la luz transmitida a través de una muestra (I_0) por el espectro de intensidad de la luz transmitida a través del blanco (I) [16]

VI. METODOLOGÍA

6.1 Evaluación del método analítico

Se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos, farmacopea y USP vigente para identificar métodos analíticos aplicables a la cuantificación de ácido clorogénico en matrices vegetales similares a las gotas de ortiga, utilizando combinaciones de palabras clave relevantes como "cuantificación de ácido clorogénico", "técnicas analíticas", "gotas de ortiga" y "validación de método". Los resultados obtenidos se filtraron para identificar estudios que describieran métodos analíticos adecuados para el objetivo de este trabajo.

6.2 Desarrollo del método de cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga para garantizar la homogeneización del producto terminado.

6.2.1 Preparación de las gotas de ortiga

En un beaker de 100 ml, preparar la solución de conservantes adicionando 4 ml de agua y metilparabeno y propilparabeno sódico, posteriormente en un beaker de 500 mL homogenizar durante 5 minutos mediante agitación magnética 240 mL de solución hidroalcohólica al 70° GL y la solución de conservantes. En un beaker de 800 mL agregar la ortiga en polvo y humectar con la solución preparada anteriormente. Mezclar bien hasta que toda la materia prima vegetal quede completamente sumergida y humectada, dejar en maceración durante 48 horas, durante este tiempo mezclar cada 12 horas durante 15 minutos; pasadas las 48 horas se deberá filtrar el material vegetal humectado. Adicionar el producto filtrado a una probeta de 200 mL y llevar a volumen de 100 mL garantizando un grado alcohólico entre 50° y 60° GL con ayuda de un alcoholímetro manual, adicionando agua purificada o alcohol etílico según sea el caso.

6.2.2 Preparación del placebo

En un beaker de 100 ml, preparar la solución de conservantes adicionando 4 ml de agua y metilparabeno y propilparabeno sódico, posteriormente en un beaker de 500 mL homogenizar durante 5 minutos mediante agitación magnética 240 mL de solución hidroalcohólica al 70° GL y la solución de conservantes previamente preparada, mezclar durante 5 minutos para homogeneizar ambas soluciones. Medir en una probeta 100 ml de la mezcla anteriormente preparada garantizando

un grado alcohólico entre 50° y 60° GL con ayuda de un alcoholímetro manual, adicionando agua purificada o alcohol etílico según sea el caso.

6.2.3 Preparación de la solución madre del estándar de ácido Clorogénico

Pesar 10 mg de Ácido Clorogénico estándar y llevarlos a un balón volumétrico de 100,0 mL para obtener una concentración de 100 ppm, llenar el balón con metanol hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 15 minutos aforar con el mismo solvente.

6.3 Protocolo de validación para cuantificación de ácido clorogénico

La USP vigente en el capítulo general <1225> para validación de procedimientos farmacopéicos, suministra información de los parámetros requeridos dependiendo de las categorías analíticas a las cuales se encuentre asociado el método. Los métodos que son objeto de estudio en el presente trabajo pertenecen a la categoría I ya que esta define los procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activo, en este protocolo se detalla el procedimiento paso a paso llevado a cabo para evaluar las características de desempeño de la técnica analítica seleccionada para la cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga a través de este se evaluaron parámetros como la linealidad, precisión y exactitud del método.(ver anexo 1)

6.4 Validación del método de cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga.

Durante la validación de procedimientos analíticos, se evalúan con ayuda de Statgraphics estadísticamente varios parámetros y características de desempeño como selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia (reproducibilidad) y criterios de aceptación para garantizar que el método cumpla con los requisitos previstos. En este caso, se evaluaron estos aspectos utilizando el estándar de ácido clorogénico, que es un ácido fenólico natural con el objetivo de obtener datos confiables y precisos para el procedimiento analítico.

6.4.1 Preparación de las muestras para las lecturas en el espectrofotómetro.

Tomar 5 mL de gotas de ortiga, filtrar y transferir a un tubo de ensayo. Luego, se agregan 2 g de sulfato de amonio y se mezclan esporádicamente durante 1 hora. Después de filtrar nuevamente,

se toma 1 mL es llevado a estufa y se evapora a 70°C. Finalmente, el residuo se disuelve con metanol y se lleva a volumen de 50ml.

6.4.2 Preparación del placebo utilizado para las lecturas en el espectrofotómetro.

Tomar 5 mL de la solución placebo, filtrarlas y transferirlas a un tubo de ensayo. Luego, se agregan 2 g de sulfato de amonio y se mezclan esporádicamente durante 1 hora. Después de filtrar nuevamente, se toma 1 mL de las gotas y se evapora a 70°C. Finalmente, el residuo se disuelve con metanol y se lleva a volumen de 50ml.

6.4.3 Selección de longitud de onda

Se realizó un barrido espectral en un rango de 240 nm a 400 nm para la determinación de la longitud de onda a la cual se presenta el pico máximo de absorción del principio activo ácido clorogénico utilizando metanol.

6.4.4 Selectividad

Realizar 10 veces las lecturas del blanco a la longitud de onda de máxima absorción obtenida del barrido espectral en el rango de 240 nm a 400 nm

6.4.5 Linealidad

Preparar una solución concentrada a 100,0 ppm por triplicado de ácido clorogénico estándar como se describe a continuación:

Pesar 10 mg de Ácido Clorogénico estándar y llevarlos a un balón volumétrico de 100,0 mL para obtener una concentración de 100 ppm, llenar el balón con metanol hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 15 minutos aforar con el mismo solvente.

Preparar por triplicado a partir de cada una de las soluciones concentradas de 100,0 ppm de ácido clorogénico diluciones de 1,0 ppm, 5,0 ppm, 10,0 ppm, 15,0 ppm y 20,0 ppm.

6.4.6 Precisión

Repetibilidad: De las soluciones preparadas para la linealidad a una concentración de 10,0 ppm se realizan 9 lecturas consecutivas y se verifica la respuesta de la absorbancia a la longitud de onda máxima determinada.

Precisión intermedia:

Esta prueba la realizan dos analistas, analista A y analista B, a muestras preparadas por cada uno. Se tomaron lecturas a concentraciones de 5,0 ppm, 10,0 ppm y 15,0 ppm de ácido clorogénico y se prepararon muestras de gota de ortiga con 0,5mL, 1,0 mL y 150 mL,

6.4.7 Exactitud

- Exactitud ácido clorogénico

Las lecturas para el ácido clorogénico estándar serán preparadas por triplicado a las concentraciones de 5,0 ppm, 10,0 ppm y 20,0 ppm a partir de una solución concentrada a 100,0 ppm como se describe en la prueba de linealidad y a tres muestras de gota de ortiga con 5,0 mL, 10,0 mL y 20 mL.

- Exactitud gotas de ortiga

Se utiliza la adicción de un patrón y se añade sobre muestras conocidas a tres niveles de concentración de un analito dentro del rango a estudiar realizar por triplicado. Para determinar la exactitud se hallan las respuestas experimentales para cada concentración y se comparan con los resultados obtenidos por interpolación en la recta de calibración para las mismas concentraciones de analito.

VII RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Evaluación del método analítico

La revisión bibliográfica reveló que los métodos más utilizados para la cuantificación de ácido clorogénico son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrofotometría UV-VIS y la cromatografía en capa fina (CCF), Se encontró que la elección del solvente de extracción influye en la posición exacta del máximo de absorción, entre los solventes más comúnmente utilizados está el etanol, metanol y mezclas acuosas de estos, además se encontró que el ácido clorogénico presenta una absorción máxima en el rango de 328 a 332 nm. Teniendo clara la información obtenida se procede a seleccionar la técnica analítica a emplear, en este caso se optó por la espectrofotometría UV-VIS, por su rapidez, simplicidad y costo que este requiere. Para seleccionar el solvente y forma de tratamiento de la muestra se realizaron varios ensayos utilizando diferentes matrices (metanol, etanol, agua, metanol-agua) y preparaciones de la muestra teniendo variables como temperatura, agitación y tiempos. Para verificar la mejor respuesta se realizaron escaneos a las muestras en el UV-VIS con el fin de identificar que preparación arrojaba mejores resultados en la longitud de onda de 328nm a 332nm referenciadas en la literatura. Es así como se encuentra que utilizar metanol y calor en la muestra dan los mejores resultados.

7.2 Desarrollo del método de cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga

Se prepararon las muestras requeridas, especificadas en la metodología numeral 6.2, obteniendo 100mL de gotas de ortigas y 100mL del placebo suficientes para las pruebas necesarias para la validación del método.

7.3 Protocolo de validación para cuantificación de ácido clorogénico

se definieron las pruebas, parámetros de validación y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método para la cuantificación de Ácido clorogénico en gotas de ortiga siguiendo la información suministrada por la USP. Ver anexo 1.

7.4 Validación del método de cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga

7.4.1 Barridos espectrales

Para los barridos espectrales realizados a 3 muestras del estándar de ácido clorogénico a una concentración de 10,0 ppm preparadas independientemente, el pico de absorción máximo que se presenta es a una longitud de onda de 329 nm en el rango espectral de 240 nm a 480 nm. La longitud de onda determinada en las tres muestras anteriores permite confirmar este valor como referente para el desarrollo de las demás pruebas analíticas. En este caso el criterio de aceptación indica que los barridos espectrales deben presentar un pico máximo de absorción a la misma longitud de onda y la absorbancia de cada una de las muestras evaluadas entre si un coeficiente de variación $\leq 5\%$

7.4.2 Selectividad

Al realizar la lectura de 10 muestras del blanco (Metanol) se obtuvo un valor promedio de absorbancia de 0,000699 y una desviación estándar de 0,000315927 estos datos muestran una cercanía estadísticamente significativa entre ellos y evidencian la proximidad de los valores de absorbancia a cero mostrando así que pueden generar muy poca interferencia al evaluar las diferentes concentraciones de ácido clorogénico estándar y posteriormente al analizar el activo de la materia prima ortiga (ácido clorogénico) en procesos de índice de mezclado del producto terminado gotas de ortiga.

7.4.2 Linealidad

Se realizó la curva de calibración utilizando diferentes concentraciones con el fin de evaluar la proporcionalidad de la concentración (ppm) frente a su respuesta en absorbancia (Abs.).

Con los datos obtenidos se realizó un modelo de regresión lineal dando un coeficiente de correlación igual a 0,998001 el cual describe una estrecha relación entre la variable de respuesta (absorbancia) y la concentración en (ppm) a 329 nm, esto dado mediante la siguiente ecuación del modelo ajustado.

$$\text{ABSORBANCIA} = 0,00580601 + 0,060614 * \text{CONCENTRACIÓN}$$

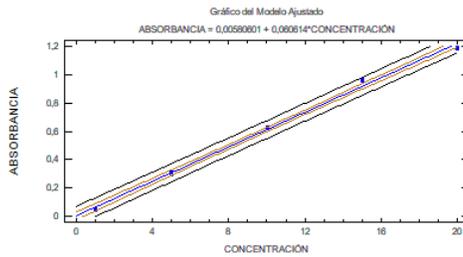


Figura 1: Modelo de regresión Lineal

Además, se obtuvo un R-cuadrada de 99,6005% y un R-cuadrado (ajustado para g.l.) igual a 99,5698% que explica la variabilidad de los datos obtenidos en la respuesta.

El estadístico t para la pendiente es igual a 56,9316 siendo este valor mayor que el t de student (2,120) para n-2 grados de libertad indica que la probabilidad de b debe ser ≠ de 0 es muy elevada por ende se acepta la hipótesis alternativa con un 95,0% de confianza.

Debido a que los límites de confianza para el término independiente o intercepto son de -0,00720076 a 0,0181161 incluyendo el cero (0) se puede decir que el método cumple con la condición de proporcionalidad.

El coeficiente de variación de los factores de respuesta es igual a 3,02325% lo que indica el cumplimiento al ser menor al 5,0%, la desviación estándar por su parte nos muestra un valor de 0,00474962 lo que nos indica la cercanía de cada valor evaluado a la media.

El valor-P para la prueba de normalidad, Estadístico W de Shapiro-Wilk es mayor a 0,05 se puede estimar que los datos obtenidos en los factores de respuesta provienen de una distribución normal.

7.4.3 Precisión

- **Repetibilidad**

Al realizar las lecturas de absorbancia se obtuvieron los datos estadísticos que se muestran a continuación para el estándar de ácido clorogénico y las muestras de gotas de ortiga.

Tabla 1. Resumen estadístico de la prueba de Repetibilidad

MUESTRA	ÁCIDO C. 10 ppm	G. ORTIGA
RECuento	10	10
PROMEDIO	0,60522	0,70519
DESVIACION	0,00514928	0,00513884
COEFICIENTE DE VARIACION	0,8508117	0,72871695
MINIMO	0,5984	0,6986

MAXIMO	0,6157	0,717
RANGO	0,0173	0,0184
SESGO ESTANDARIZADO	0,66598259	1,31101517
CORTUIS ESTANDARIZADA	0,99877613	2,61622527

Además, se encuentran los intervalos de confianza para absorbancia en

- Ácido clorogénico:

Intervalos de confianza del 95,0% para la media: 0,4815 +/- 0,000431415 [0,481069; 0,481931]

Intervalos de confianza del 95,0% para la desviación estándar: [0,000379099; 0,00107522]

- Gotas ortiga

Intervalos de confianza del 95,0% para la media: 0,4018 +/- 0,00140468 [0,400418; 0,403227]

Intervalos de confianza del 95,0% para la desviación estándar: [0,00123434; 0,0035009]

Se observa en la tabla 1 para el ácido clorogénico que el coeficiente de variación es igual a 0.8508117% la desviación estándar es de 0,00514928 indicando que existe cercanía entre los datos, de igual manera para las gotas de ortiga tenemos un coeficiente de variación de 0,905104% y una desviación estándar de 0,897456.

Con un nivel de confianza del 95,0% se puede inferir que los datos obtenidos para el ácido clorogénico a 10 ppm se encuentran entre valores de absorbancia de 0,211783; 0,214473 y nivel de concentración de 98,513 ppm y 99,797ppm.

- Precision intermedia

Al realizar los ensayos por el analista A y Analista B para los tres niveles de concentración en las muestras de ácido clorogénico y se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 2. ANOVA análisis de varianza estudio R&R.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Operadores	0,00000280845	1	0,00000280845	0,26	0,6170
Partes	0,0211257	2	0,0105629	983,72	0,0000
Residual	0,000150327	14	0,0000107377		
Total	0,0212789	17			

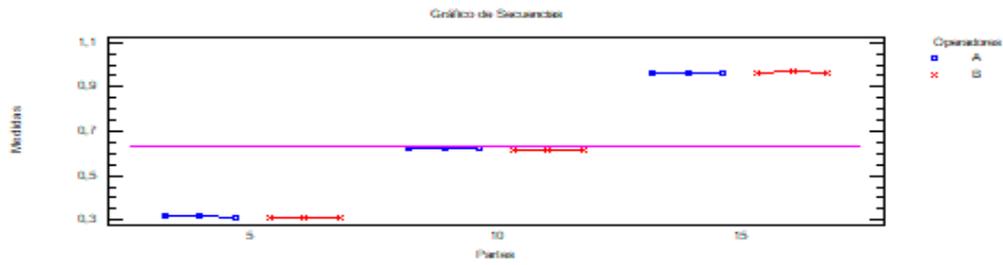


Gráfico 1. Gráfico de secuencias o comportamiento de los analistas para los tres niveles de concentración. En el análisis de varianza al 95,0% de confianza mostrado en la tabla 2 se observa que el valor-p para los operadores es de 0,6170 siendo mayor de 0,05 lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de Absorbancias obtenidos por los analistas A y B, además no existe diferencia estadísticamente significativa en la relación operadores (analistas) y partes(concentración). Lo antes dicho se puede verificar en el gráfico de secuencia, los cuales demuestran gráficamente la cercanía de los resultados obtenidos por cada operador y entre ellos mismos.

7.4.5 Exactitud

- **Exactitud ácido clorogénico**

Con la ecuación de la recta obtenida en la prueba de la linealidad se obtiene la concentración real y el porcentaje de recuperación obtenido de ácido clorogénico, en la tabla 3 se observa además que la concentración hallada y la concentración teórica tienen datos muy cercanos o similares, y un porcentaje de recuperación superior al 99,00%, concluyendo que el método posee la exactitud necesaria para la validación.

Tabla 3. Datos obtenidos en el ensayo de exactitud y porcentajes de recuperación en ácido clorogénico

MUESTRA	[] (ppm)	ABSORBANCIAS	ppm obtenidas	%Recuperación
1	5	0,3155	5,301	106,017
2	5	0,3121	5,245	104,895
3	5	0,3142	5,279	105,588
1	10	0,6179	10,290	102,898
2	10	0,6186	10,301	103,013
3	10	0,6187	10,303	103,030
1	15	0,9632	15,987	106,577
2	15	0,9542	15,838	105,587
3	15	0,9574	15,891	105,939

La recuperación es satisfactoria (media) mayor al 99% y el coeficiente de variación de 1,6

Exactitud gotas de ortiga

Tabla 4. Datos obtenidos en el ensayo de exactitud y porcentajes de recuperación. en gotas de ortiga

Concentración	Respuesta	Interpolación	%Recuperación
1ppm	0,06721	0,0664	101,21
1ppm	0,06648	0,0625	101,18
1ppm	0,06617	0,0648	99,29
5ppm	0,34182	0,0339	98,96
5ppm	0,34231	0,0318	99,93
5ppm	0,34138	0,0332	97,28
10ppm	0,66175	0,6642	100,37
10ppm	0,66213	0,6698	99,97
10ppm	0.66321	0,6641	101,11
media			99,9%
CV			1,28

Con el método de adicción de patrón se pudo cuantificar la cantidad de ácido clorogénico en gotas de ortiga, arrojando una media del 99,9% de recuperación.

Al culminar las pruebas realizadas para la validación del protocolo los resultados de la validación demuestran que el método espectrofotométrico UV-VIS desarrollado para la cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga es preciso, exacto, lineal y selectivo. La elección del metanol como solvente de extracción, junto con las condiciones óptimas de análisis, permitió obtener una señal analítica fuerte y específica para el compuesto de interés. La excelente linealidad del método, evidenciada por el alto coeficiente de correlación, garantiza la precisión de las cuantificaciones en un amplio rango de concentraciones. Los bajos coeficientes de variación obtenidos en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad demuestran la alta precisión del método. Además, los porcentajes de recuperación confirman la exactitud de las mediciones. La selectividad del método fue demostrada mediante el análisis de blancos y la ausencia de interferencias significativas.

VII CONCLUSIONES

- El método analítico propuesto, basado en espectrofotometría UV/VIS, ha demostrado ser una herramienta eficaz y confiable para la cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga. La validación del método ha revelado una excelente linealidad, precisión y exactitud en el rango de concentraciones estudiado, lo que garantiza la confiabilidad de los resultados obtenidos.
- El método desarrollado proporciona una base sólida para asegurar la homogeneidad del producto terminado. Al permitir la cuantificación precisa y reproducible del ácido clorogénico en diferentes muestras, se puede verificar si el contenido de este compuesto bioactivo es uniforme en todo el lote, cumpliendo así con los estándares de calidad establecidos.
- Se ha validado satisfactoriamente un método analítico basado en espectrofotometría UV/VIS, el cual ha demostrado ser preciso, exacto y reproducible para la cuantificación de ácido clorogénico en gotas de ortiga.
- La validación exhaustiva del método ha demostrado que cumple con todos los criterios de aceptación establecidos, lo que lo convierte en una técnica analítica robusta y confiable para la implementación en el laboratorio de control de calidad. Este método puede ser utilizado de forma rutinaria para garantizar la calidad y la consistencia de las gotas de ortiga a lo largo del proceso productivo.

REFERENCIAS

- [1] Pomboza-T, et al. (2016). Hábitats y usos tradicionales de especies de *Urtica* l. en la cuenca alta del Río Ambato, Tungurahua-Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(2), 1-10. [en línea] Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsab/v4n2/v4n2_a02.pdf

- [2] ICA. (2011). *Plantas aromáticas y medicinales: Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos*. Bogotá, D.C.: Instituto Colombiano Agropecuario. Disponible en <https://bit.ly/3LOnaa3>

- [3] Gordillo, G. (2018). *Estudio farmacognóstico de los Productos Naturales procesados de uso medicinal de *Urtica dioica* L. (ortiga) y de su extracto vegetal* [Tesis de maestría, Universidad Central del Ecuador]. Disponible en <https://bit.ly/3YrbS33>

- [4] INVIMA (2024) Sala Especializada de Medicamentos Fitoterapéuticos, Homeopáticos y Suplementos Dietarios. Bogotá, D.C. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Recuperado de <https://bit.ly/4d72Blb>

- [5] Ministerio de Salud de Chile (MHT). (s.f.). *Medicamentos herbarios tradicionales - ortiga*. Recuperado de <https://www.minsal.cl/mht/>

- [6] Moreno, X. (2017). Evaluación del grado de homogeneidad de mezclas de paracetamol y lactosa en un mezclador en V. *Revista de Ingeniería de la Universidad de La Laguna*, 18(1), 43-50. disponible en <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/6817>

- [7] Moreno, E. (2008). *Validación en proceso de mezclado en la fabricación de un alimento enriquecido con vitaminas y minerales*. [Tesis de maestría, Universidad de los Andes]. Recuperado de <https://bit.ly/46t2JZP>

- [8] Huerta, C. (2007); *Ortiga Mayor: *Urtica Dioica**, Universidad de Zaragoza. Facultad de Medicina. *Medicina naturista*, Jul, Recuperado de: <https://bit.ly/4fyBOj9>

- [9] Abril. D. et al. (s.f.). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario Rabanales, Recuperado de <https://bit.ly/4fvIX4P>
- [10] República de Colombia. (2018, 11 de julio). Decreto 1156 de 2018. Disponible en <https://bit.ly/3SXwXP9>
- [11] INVIMA (s.f.). Validación de métodos Analíticos Bogotá, D.C. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Recuperado de <https://bit.ly/3SCz1vI>
- [12] Bermejo. M, (2023). Mezcla, universidad de valencia Depto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Recuperado de <https://www.uv.es/~mbermejo/Mezcla.pdf>
- [13] Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). Guía Técnica 1: Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición. Recuperado de <https://bit.ly/4dswD2n>
- [14] López M. et al (2014) Determinación del contenido de ácido clorogénico por espectroscopía uv-vis en hojas secas y verdes de *cecropia peltata* (guarumo) en árboles silvestres de 10, 15 y 20 m de altura en la reserva natural laguna de apoyo, masaya marzo- junio 2013 recuperado de <https://repositorio.unan.edu.ni/272/1/64546.pdf>
- [15] J. Dueñas, B. N. (2011). Extracción y Caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos del procesamiento de alcachofas. Escuela Politécnica del Ejército, Ciencias de la Vida, Ecuador
- [16] Bermejo. M, (2023). Mezcla, universidad de valencia Depto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Recuperado de <https://www.uv.es/~mbermejo/Mezcla.pdf>
- [17] Giraldo G (S.F) validación de métodos analíticos de laboratorio. recuperado de: <https://bit.ly/3WMKivS>

- [18] USP (2023) Métodos estadísticos para la validación de procedimientos analíticos; disponible en <https://www.uspnf.com> de 1210 métodos estadísticos para la validación de procedimientos analíticos (uspnf.com)

ANEXOS

Anexo 1. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO EN PRODUCTO TERMINADO GOTAS DE ORTIGA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.

OBJETIVOS.

Garantizar la idoneidad y validez de la técnica analítica utilizada para la cuantificación de ácido clorogénico en producto termina gotas de ortiga por espectrofotometría UV-VIS.

ALCANCE.

Este método aplica para la cuantificación de ácido clorogénico por espectrofotometría UV-VIS.

RESPONSABLES.

Es responsabilidad del analista de estabilidad y validaciones la elaboración del protocolo, el desarrollo de los parámetros allí establecidos y la ejecución del informe de validación.

Es responsabilidad de jefatura de validaciones y control calidad revisar cada uno de los parámetros descritos en el protocolo y el informe de validación para garantizar que los resultados obtenidos sean acordes con los criterios de aceptación.

Es responsabilidad de dirección técnica, verificar y aprobar cada uno de los parámetros descritos en el protocolo y el informe de validación para garantizar que los resultados obtenidos sean acordes con los criterios de aceptación.

MATERIALES Y EQUIPOS.

MATERIALES	EQUIPOS
Ortiga Polvo	Espectrofotómetro UV5
Agua purificada	Software LabX
Metanol	Agitador magnético
Metilparabeno sódico	Estufa
Propilparabeno sódico	Balanza analítica
Sulfato de sodio	
Pipetas Volumétricas	
Pipetas graduadas	
Balones volumetricos	

METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Principio del método: Espectrofotometría UV-VIS.

BARRIDOS ESPECTRALES.

Se realiza un corrido espectral por triplicado en un rango de 240 nm a 400 nm para verificación de la longitud de onda a la cual expresa el pico de máxima absorción del ácido clorogénico.

1 Preparación de la solución madre del estándar (100 ppm): Pesar 10 mg de Ácido Clorogénico estándar y llevarlos a un balón volumétrico de 100,0 mL para obtener una concentración de 100 ppm, llenar el balón con metanol hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 15 minutos aforar con el mismo solvente.

1.1 Condiciones instrumentales:

- **Modo:** UV.
- **Rango espectral:** 240 nm a 480nm.
- **Celda:** Cuarzo de 10 mm de paso.
- **Blanco:** Metanol.

1.2 Selección de longitud de onda: Una vez realizado el barrido espectral se identifica la longitud de onda a la cual se obtiene el pico máximo de absorción y se procede a realizar los análisis correspondientes a Selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud.

1.3 Lectura de muestra en el espectrofotómetro.

- a. Ingresar al software LabX con el usuario y contraseña.
- b. Crear la tarea serie de muestras de la prueba de barridos espectrales a partir del método definido para las soluciones preparadas identificando el proceso, la cantidad de muestras y demás información solicitada en el editor de tarea.
- c. Guardar y cerrar la tarea hasta el alistamiento de las muestras.
- d. Encender el espectrofotómetro verificando la conexión de este a la red de internet de trabajo. Ingresar con usuario y contraseña.
- e. Dar inicio a la tarea o serie de muestras desde el software o el equipo.
- f. Verificar que las celdas se encuentren limpias antes de su uso.
- g. Seguir el paso a paso definido en la metodología de trabajo de la tarea o serie de muestra.
- h. Purgar mínimo tres veces las celdas antes de las lecturas de blancos o soluciones muestra.
- i. Una vez finalizada las lecturas establecidas, el software genera el informe detallado de la tarea y serie de muestras desarrolladas.
- j. Guardar e imprimir el informe.

1.5 Tratamiento estadístico barridos espectrales: Determinar el coeficiente de variación correspondiente a la absorbancia obtenida de las tres muestras evaluadas.

1.6 Criterios de aceptación de los barridos espectrales.

- Los tres barridos espectrales deben presentar un pico máximo de absorción a la misma longitud de onda.
- El coeficiente de variación de las absorbancias obtenidas de las tres muestras evaluadas debe ser $\leq 5\%$.

2 SELECTIVIDAD.

Condición analítica: La prueba la ejecuta un mismo analista, en un mismo día. Realizar 10 veces las lecturas del blanco a la longitud de onda de máxima absorción obtenida del barrido espectral en el rango de 240nm a 480 nm.

2.1 Cálculo de la relación selectiva.

Realizar el cálculo de las relaciones selectivas para las absorbancias obtenidas del blanco, con respecto a la absorbancia promedio del estándar de ácido clorogénico a la concentración más baja definida en la curva de calibración de la prueba de Linealidad.

2.2 Análisis estadístico de la selectividad: Determinar el promedio y desviación estándar de las muestras evaluadas.

Criterios de aceptación selectividad.

- La absorbancia media obtenida en las lecturas del blanco debe ser muy cercana a cero.
- El barrido espectral del blanco no debe presentar un máximo de absorbancia igual al de la muestra.
- Identificar que la relación selectiva obtenida del blanco este por encima para demostrar que el valor más bajo de la curva de calibración de la prueba de linealidad es mayor que estos.

3 LINEALIDAD.

Condición analítica: La prueba la ejecuta un mismo analista, bajo las mismas condiciones y en un mismo día. Para la determinación de la curva de calibración en la prueba de linealidad se preparan 5 concentraciones por triplicado del estándar de ácido clorogénico correspondientes a (1,0 ppm), (5,0 ppm), (10,0 ppm), (15,0 ppm) y (20,0 ppm), a partir de una solución madre igualmente por triplicado de 100,0 ppm, evaluando la proporcionalidad de la concentración (ppm) frente a su respuesta en absorbancia (Abs).

3.1 Coeficientes de correlación, determinación y pruebas de hipótesis en curva de calibración.

Solución madre de ácido clorogénico.

Pesar 10 mg de Ácido Clorogénico estándar y llevarlos a un balón volumétrico de 100,0 mL para obtener una concentración de 100 ppm, llenar el balón con metanol hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 15 minutos, aforar con el mismo solvente.

Preparar por triplicado a partir de cada una de las soluciones concentradas de 100,0 ppm de ácido clorogénico diluciones de 1,0 ppm, 5,0 ppm, 15,0 ppm, 20,0 ppm, como se describe a continuación:

3.2 Tratamiento estadístico para la curva de calibración.

- En el programa estadístico Statgraphics, anexar al libro de datos la columna con las concentraciones evaluadas (X) y la correspondiente respuesta obtenida en absorbancia (Y).
- Realizar el análisis de regresión simple Absorbancia vs Concentración.
- Seleccionar de la pestaña de tablas una vez realizado el análisis de regresión el resumen de análisis, pronósticos (predicciones) y residuos atípicos.
- En la tabla de pronósticos dar clic derecho, seleccionar opciones de ventana y en opciones de pronósticos determinar nivel de confianza del 95%, el tipo de límites de intervalo bilateral y los pronósticos en X a las concentraciones de 5,0 ppm, 10,0 ppm y 15,0 ppm.
- Seleccionar de la pestaña de gráficos los residuos vs X (residuos estudentizados) y el gráfico de modelo ajustado.

3.3 Prueba de hipótesis para la pendiente y el intercepto para la pendiente (test de linealidad y proporcionalidad).

Realizar el copiado de los datos obtenidos en la prueba de linealidad (X, Y), sus sumatorias, la pendiente (b), el intercepto (a) y el valor de t student n-2 al 95,0% confianza (**2,160**) y a partir de estos aplicar las ecuaciones para el test de linealidad y proporcionalidad.

3.4 Tratamiento estadístico para el test de linealidad y proporcionalidad: A partir de los datos obtenidos aplicar las siguientes ecuaciones.

3.5 Coeficiente de variación para los factores de respuesta.

Dividir la respuesta obtenida en absorbancia entre la concentración evaluada (Y/X) para determinar la proporcionalidad en cada nivel a la misma longitud de onda.

3.6 Criterios de aceptación prueba de Linealidad.

3.7 Criterios de aceptación curva de calibración.

- Coeficiente de correlación (r): debe ser $\geq 0,990$
- Coeficiente de determinación (r^2) ajustado con gl: debe ser $\geq 98,0\%$
- El valor-p del análisis de varianza por ANOVA para el modelo de regresión debe ser $\leq 0,05$ y la razón-F mayor a 1.

- La absorbancia promedio de la concentración de 100,0 ppm debe encontrarse entre los límites de confianza y predicción arrojados por el estadístico.
- No se deben evidenciar residuos atípicos.

3.8 Criterios de aceptación de la prueba de hipótesis de la pendiente y el intercepto.

- Pendiente (b): $b \neq 0$
- Intercepto (a): Valor ideal $a = 0$
- Los límites de confianza para el intercepto evaluados en el test de linealidad deben incluir el cero para cumplir con condición de proporcionalidad.

3.9 Criterios de aceptación para los factores de respuesta.

- Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f): debe ser $\leq 5,0\%$.
- El valor-P de la prueba de Shapiro-Wilk debe ser mayor o igual a 0,05.

4 PRECISIÓN.

4.1 REPETIBILIDAD.

Condición analítica: Esta prueba la realiza un mismo analista, bajo las mismas condiciones y en un mismo día.

- Preparar 10 veces muestra del estándar de ácido clorogénico a 100,0 ppm tal cual se describe anteriormente

Tratamiento estadístico de la repetibilidad:

- En el programa estadístico Statgraphics anexar al libro de datos los resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad y realizar análisis de una variable.
- Seleccionar de la pestaña de tablas el resumen de análisis, resumen estadístico y los intervalos de confianza.

4.2 PRECISIÓN INTERMEDIA.

Condición analítica: Esta prueba la realizan 2 analistas, a diferentes muestras, en diferentes días.

- Las lecturas serán realizadas a la longitud de onda encontrada en el barrido espectral.
- Las lecturas para el ácido clorogénico estándar del analista A y el analista B serán preparadas por triplicado a las concentraciones de 5,0 ppm, 10,0 ppm y 15,0 ppm a partir de una solución concentrada a 100,0ppm como se describe en la prueba de Linealidad

Criterios de aceptación de la prueba de precisión.

Repetibilidad.

- El coeficiente de variación para el nivel aceptable de la solución estándar a 100,0 ppm debe ser $\leq 5\%$.

Precisión intermedia.

- No existen diferencias estadísticamente significativas entre analistas con relación a los estimados entre las muestras evaluadas en el estudio R&R por el método de varianza.
- El porcentaje de variación total debido al estudio R&R debe ser $\leq 10,0\%$ para las muestras preparadas con ácido clorogénico estándar en cada una de las concentraciones establecidas.

5 EXACTITUD.

Condición analítica: Esta prueba la realiza un mismo analista, bajo las mismas condiciones y en un mismo día.

- Las lecturas serán realizadas a la longitud de onda encontrada en el barrido espectral.
- Las lecturas para el ácido clorogénico estándar serán preparadas por triplicado a las concentraciones de 5,0 ppm, 10,0 ppm y 15,0 ppm a partir de una solución concentrada a 100,0ppm como se describe en la prueba de Linealidad

Criterios de aceptación de la prueba de exactitud.

- No debe existir diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas promedio de cada concentración mediante el test de Cochran.
- No debe encontrarse diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 % mediante una prueba t (student).