

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
POLIFENOLES TOTALES EN PRODUCTOS ELABORADOS CON TÉ VERDE
POR MÉTODO COLORIMÉTRICO FOLIN CIOCALTEU.

CATALINA URBANO ROJAS

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA

2016

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
POLIFENOLES TOTALES EN PRODUCTOS ELABORADOS CON TÉ VERDE
POR MÉTODO COLORIMÉTRICO FOLIN CIOCALTEU.

CATALINA URBANO ROJAS

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA

DIRECTOR: CLAUDIA PATRICIA MARÍN, MBA

DIRECTOR: GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ, Ph. D

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA

2016

Aprobado por:

**Nombre correspondiente
Evaluador**

**Nombre correspondiente
Evaluador**

**Claudia Patricia Marín, MBA
Director del Proyecto**

**Guillermo León Montoya Peláez, Ph. D
Director del Proyecto**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fuerza para llegar aquí.

A mis padres por apoyarme con todo su amor y entregar en este proceso. A mis amigos por estar siempre a mi lado y compañeros de clase y de grupo de investigación por todos los momentos compartidos

A la Universidad Icesi por la formación como futura Química Farmacéutica.

A mis directores de proyecto de grado la doctora Claudia Patricia Marín y doctor Guillermo León Montoya, por brindarme todo su conocimiento, sus orientaciones, su esfuerzo y dedicación, los cuales han sido fundamental para terminar con esta etapa.

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido.....	5
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE GRÁFICAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ANEXOS	9
RESUMEN DEL PROYECTO	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	13
2.1 Planteamiento y justificación del problema	13
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	14
2.2.1. Té verde	14
2.2.2. La validación de métodos analíticos	15
2.2.3. El método de Folin Ciocalteu	17
2.2.4. Lector de placas y análisis automatizados de alta capacidad	19
2.3 OBJETIVOS.....	20
2.3.1 Objetivo General.....	20
2.3.2 Objetivos Específicos.....	20
2.4 METODOLOGÍA	21
2.4.1 Extracción de la muestra.....	21
2.4.2. Preparación de reactivos	21
2.4.3. Preparación de la microplaca.....	22
2.4.4. Preparación del Equipo.....	23
2.4.5. Evaluación de datos.....	23
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
2.5.1. Validación del método de Folin – Ciocalteu	24
3. CONCLUSIONES.....	29
4. RECOMENDACIONES	30
5. REFERENCIAS.....	31
6. ANEXOS	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Datos obtenidos para precisión intermedia y repetibilidad	25
Tabla 2 Datos experimentales del ácido gálico para evaluar la exactitud y criterio de aceptación	27
Tabla 3 Datos para la determinación de los límites de detección y cuantificación.	27
Tabla 4 Límite de cuantificación y límite de detección	28
Tabla 5 Comparación entre un té comercial líquido y un té material vegetal..	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE GRÁFICAS

Grafico 1. Curva de calibración del estándar.....	24
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de oxidación del fenol a quinona.....	17
Figura 2. Estructura del ácido gálico.....	18
Figura 3. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu, sacado de (García Martínez, Fernández Segovia, & Fuentes López, 2015).....	19
Figura 4 Microplaca después de la reacción de Folin – Ciocalteu.	22

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de validación del método analítico para la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde por el método colorimétrico Folin - Ciocalteu	34
Anexo 2. <i>Procedimiento operativo estándar (POE) de la</i> utilización del método de Folin Ciocalteu en la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde	50
Anexo 3. Procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización del software Galeno	56

RESUMEN DEL PROYECTO

Los polifenoles componen un extenso grupo de sustancias con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividades biológicas. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos. La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización de distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Además, sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos. Por esta razón, la Universidad Icesi y el Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ) se vieron en la necesidad de contar con un método validado para la cuantificación de los polifenoles totales dentro de su portafolio de métodos analíticos de manera que se pueda ofrecer como un servicio de análisis a la industria en el Valle del Cauca y que se pueda asegurar la calidad de los diversos productos que contienen dichas moléculas. Acorde con lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue el desarrollo y validación del método colorimétrico Folin Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde.

Se debe tener en cuenta que los métodos que son utilizados en los laboratorios de análisis químico y control de calidad deben ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurar que producen resultados que son válidos, coherentes y reproducibles. Para el caso de este método colorimétrico, se evaluaron los siguientes parámetros: precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, selectividad, linealidad, especificidad, límite de cuantificación y límite de detección. Este proceso de validación se realizó por medio del cumplimiento de los requisitos destacados en la norma ICH Q2 (R1) (Conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para humanos).

Transcurrido el proceso, se consiguieron datos que confirmaron que el método de Folin Ciocalteu es idóneo para su aplicación bajo unas condiciones específicas de trabajo, cumplimiento con los parámetros de validación. Además, se realizó la medición de té en presentación líquida, para comparar las concentraciones de polifenoles que están contenidos en esta presentación.

Palabras claves: Validación, método de Folin – Ciocalteu, té verde, polifenoles, ácido gálico.

ABSTRACT

Polyphenols comprise a large group of substances with different chemical structures and properties, and diverse biological activities. Chemically, phenolic compounds are substances that possess an aromatic ring, with one or more hydroxyl groups. The ability of polyphenols to modulate the activity of different enzymes, and to, consequently, interfere with the signaling mechanisms of different cellular processes, may be due to, at least partly, the physicochemical characteristics of these compounds, that allow them to participate in cellular metabolic reactions of oxidation-reduction. Moreover, their antioxidant properties explain many of its beneficial effects. For this reason, the University ICESI and the Laboratory of Chemical Instrumentation (LIQ, for its acronym in Spanish) was in need of a validated method for the quantification of total polyphenols, within its portfolio of analytical methods, so that this could be offered as an analysis service for the industry in Valle del Cauca, and that the quality of various products containing such molecules could be ensured. Consistent with the above, the objective of this project was the development and validation of the Folin Ciocalteu colorimetric method for the quantification of total polyphenols in products made with green tea.

It should be noted that the methods that are used in chemical analysis and quality control laboratories, should be evaluated and tested to ensure that the produced results are valid, consistent and reproducible. For the mentioned colorimetric method, the following parameters were evaluated: precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, selectivity, linearity, specificity, limit of quantification and detection limit. This validation process was performed in compliance with the requirements featured in the ICH Q2 (R1) guideline (International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Humans).

After the process, the data obtained confirmed that the Folin Ciocalteu method is suitable to be used under specific working conditions, meeting the validation parameters. In addition, measurement of tea in liquid form was performed, to compare the concentrations of polyphenols that are contained in this presentation.

Keywords: Validation, Folin–Ciocalteu method, green tea, polyphenols, Gallic acid.

1. INTRODUCCIÓN

La industria del té ha ido tomando fuerza en todo el mundo, catalogándolo como una de las tres bebidas más populares bebido a que en su contenido tiene polifenoles totales, los cuales aportan beneficios al ser humano, ya que las propiedades que se contribuyen y muchas de ellas están comprobadas como el ser antioxidante y la prevención en el envejecimiento celular (isoflavonas y catequinas). (Sis, 2015).

Según artículos encontrados se observa que una de las catequinas (epigallocatequina-3 galato) presente en té verde ha sido muy estudiada como un inhibidor en la proliferación celular e inducir la apoptosis en una variedad de neoplasmas humanos. Lo que es de gran ayuda en diferentes tratamientos preventivos en la formación de cáncer en diferentes órganos, ya que esta catequina inhibe la actividad de las enzimas y las vías de transducción de señales. (Chung S. Yang, 2009). Además, se encuentran otros estudios en humanos sobre el uso de las catequina del té verde para tratar los síndromes metabólicos, tales como la obesidad, la diabetes tipo II y los factores de riesgo cardiovascular.

Otros estudios indican que él té verde tiene actividad antiproliferativa en células del hepatoma y actividad hipolipemiente sobre estas, además de la prevención de la hepatotoxicidad. El té verde podría actuar como agentes quimiopreventivos, de igual manera existen estudios en donde se observa que el té verde, su extracto y sus constituyentes son eficaces para la prevención del estrés oxidativo y problemas neurológicos. (Sabu M Chacko, 2010)

Por todo lo anterior es de gran importancia que en Colombia específicamente en el departamento del valle, se encuentra una de las compañías que han colaborado en el aumento de las cadenas operativas y a generando innovación como lo la marca Té Hindú (Agrícola Himalaya), teniendo esta empresa en nuestro departamento, es de gran importancia desarrollar un método con el cual se pueda cuantificar los polifenoles totales contenidos en el té verde como lo es el método de Folin – Ciocalteu, para así asegurar a los consumidores del té verde hindú que este posee los beneficios que se han encontrado en diferentes estudios. El método de Folin – Ciocalteu consiste en la generación de un complejo colorimétrico que se genera cuando los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin, y este es detectado por medio de espectrofotométricamente a 765 nm.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento y justificación del problema

El incremento del uso de té verde se debe a que este tiene beneficios para la salud, ya que estudios sobre los diferentes tipos de té indican que el té verde contiene mayor cantidad de catequinas y sus derivados de galato. Estos son los principales compuestos responsables de las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras que tiene el té para la protección de la salud (Uchenna J. Unachukwu, 2010). Debido a que las investigaciones sobre los polifenoles en productos elaborados a base de té verde en la actualidad se han aumentado, es vital que los medicamentos o productos de origen natural que contengan estas sustancias como principios activos, deban ser analizados con métodos analíticos validados que permitan garantizar la calidad de los mismos (Rodríguez-Amado, Escalona-Arranz, & Rodríguez-Romerol, 2011).

La validación de este método permitirá la cuantificación de los polifenoles totales presentes en productos elaborados con té verde, además de establecer pruebas documentales y así comprobar con un alto grado de confiabilidad de que un proceso analítico, se puede efectuar con especificaciones y requisitos necesarios para que se realice de manera adecuada. La validación de este método servirá como base a futuras investigaciones en las que se pretenda evaluar polifenoles totales en el marco de diversas condiciones experimentales o industriales que brinde con seguridad resultados fiables y adecuados. Por lo dicho anteriormente, se debe realizar la validación del método de manera rigurosa.

La validación del método colorimétrico para la determinación de polifenoles en muestras de té se debe realizar mediante la verificación en el cumplimiento de los parámetros que se encuentran en la norma “Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Humanos (ICH Q2 (R1)).

Con la validación del método de Folin Ciocalteu se podrán obtener los límites y condiciones en los cuales se obtienen los resultados más adecuados para la cuantificación de los polifenoles totales en diferentes matrices.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1. Generalidades sobre el Té verde

La industria del té ha ido tomando fuerza en todo el mundo, catalogando esta bebida como una de las tres más populares a nivel mundial. Esta industria nace de una leyenda que cuenta que su descubrimiento fue en China por un emperador llamado Shen-Nung, quien, al observar que las personas eran más sanas cuando bebían agua caliente, insistió que todos tomaran esta precaución. A Colombia llega en 1960, de la mano de Jaibel, una de las compañías más importantes del sector en este momento. Esta empresa comenzó sus producciones con una máquina empacadora manual que producía dos bolsas por minuto y se envasaba todo de manera artesanal en cada bolsa aromática (Álvarez Jaramillo, Riveros, & Suárez Daza, 2011).

La cadena operativa de la industria del té ha ido creciendo y llenándose de innovación patrocinada por cuatro de las compañías más importantes del sector: Jaibel, Hindú, Tisanas Oriental - Termoaromas y Tisanas Orquídea. Estas están ubicadas en los departamentos del Valle (Hindú y Termoaromas) (Álvarez Jaramillo, Riveros, & Suárez Daza, 2011).

Aspectos farmacológicos y usos terapéuticos

Se ha observado que una de las catequinas (epigallocatequina-3 galato) presentes en el té verde tiene una posible actividad como inhibidor en la proliferación celular e inductor de la apoptosis en una variedad de neoplasmas humanos. Esto es de gran ayuda en diferentes tratamientos preventivos que retrasen o eviten la formación de cáncer en diferentes órganos, ya que esta catequina inhibe la actividad de las enzimas y las vías de transducción de señales (Chung S. Yang, 2009). Además, se encuentran otros estudios en humanos sobre el uso de las catequinas del té verde para tratar los síndromes metabólicos, tales como la obesidad, la diabetes tipo II y los factores de riesgo cardiovascular. (Sabu M Chacko, 2010)

Otros estudios indican que el té verde tiene actividad antiproliferativa en células de hepatoma y actividad hipolipemiente sobre estas, además de la prevención de la hepatotoxicidad. El té verde podría actuar como agente quimiopreventivo. De igual manera, existen estudios en los que es posible observar que el té verde, su extracto y sus constituyentes son eficaces para la prevención del estrés oxidativo y problemas neurológicos (Sabu M Chacko, 2010).

Se ha comprobado que el té verde tiene alta capacidad antioxidante debido al contenido de vitamina C y E. Además, también contiene y catequinas, que junto con las vitaminas, son ideales para prevenir el envejecimiento celular, tanto de los órganos como de la piel. Con los alcaloides, se observa su virtud estimulante que

ayuda a mantenerse activo durante el día o durante la noche y por último los polifenoles que son muy importantes para la salud y la digestión (Sis, 2015).

2.2.2. La validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es un paso fundamental que permite establecer la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos (Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI), 2001).

Toda validación comienza a partir de un método ya aprobado y ajustado. La validación trata de demostrar que tanto el método de análisis como su sistema analítico producirán resultados adecuados. Dicha demostración debe ser documentada de la siguiente manera: protocolo de validación, realización de la validación, evaluación de resultados analíticos, informe de validación y un certificado de validación (ICH, 1994).

Para desarrollar dicha validación se pretenden evaluar los siguientes parámetros: exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), linealidad, rango, límite de detección, límite de cuantificación y selectividad; el cumplimiento de estos llevará a generar datos robustos y confiables. Asimismo, se necesita conocer con claridad cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación. Es esencial conocer el método a validar y su aplicabilidad; es decir, el analito, su concentración y la matriz, implementos de laboratorio y definir los cálculos que se usarán (Instituto de Salud Pública Chile, 2010). Una vez efectuado lo anterior se puede empezar con la comprobación de los parámetros de validación.

La exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta, ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado versus el valor encontrado. Se debe demostrar en todo el rango especificado, además de realizar un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado. El rango para evaluar la pureza de un principio activo en producto acabado es de 80% -120%. El cálculo para determinar la exactitud se expresa como el porcentaje de la diferencia entre el promedio y el valor teórico, teniendo en cuenta los intervalos de confianza (Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI), 2001).

La precisión

La precisión de un método analítico muestra el grado de dispersión entre una serie de múltiples medidas desde una misma muestra homogénea. La realización de la toma de datos se lleva a cabo para obtener una desviación estándar menor y de esta

manera determinar la variabilidad del método. La precisión se establece por medio de diferentes tipos de estudios como: la repetibilidad, precisión intermedia y la reproducibilidad. Para la repetibilidad se estudia la variabilidad del método realizando una serie de análisis, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto; la precisión intermedia de igual manera que la repetibilidad estudia la variabilidad del método, pero en condiciones operativas diferentes como: diferentes analistas, aparatos, días entre otros y en un mismo laboratorio. Para la reproducibilidad se estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes en distintos laboratorios. (Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI), 2001)

Límites de cuantificación y detección

Otros parámetros a evaluar son el límite de cuantificación el cual determina la cantidad mínima de analito presente en la muestra que se puede establecer con una adecuada precisión y exactitud. Por otro lado, el límite de detección es la cantidad mínima de analito de muestra que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar. (ICH, 1994)

La linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido; para el cumplimiento de este parámetro se necesita que los datos describan un comportamiento lineal cuando se hace una regresión de este tipo que relaciona las variables conocida y del equipo. (ICH, 1994)

El rango es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método. (Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI), 2001)

La selectividad

Es la capacidad de un método analítico para medir e identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés en presencia de otras sustancias químicas es el parámetro de selectividad. (ICH, 1994)

Por último, encontramos el parámetro de especificidad es la capacidad de evaluar un analito de interés en presencia de los componentes que pueden estar dentro de la matriz pero que no son de importancia para la medición (Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI), 2001).

2.2.3. El método de Folin Ciocalteu

Diversas patologías van acompañadas de la producción de radicales libres, especialmente los del oxígeno. Estos radicales libres se producen inevitablemente como consecuencia del metabolismo oxidativo y atacan las biomoléculas constituyentes de los seres vivos como el ácido desoxirribonucleico (ADN), lípidos y proteínas tanto enzimáticas como estructurales, entre otros. Lo anterior se genera principalmente por el estrés oxidativo (García Martínez, Fernández Segovia, & Fuentes López, 2015).

El estrés oxidativo es producido por un desbalance entre la producción de radicales libres y mecanismos antioxidantes que genera un incremento de especies radicalarias. Una de las formas de detener este desbalance es el suministro de antioxidantes que son capaces de captar y neutralizar los radicales libres.

Un grupo especial de antioxidantes naturales muy importantes son los polifenoles; estos, como su nombre lo indica, contienen dos o más radicales fenólicos (Velásquez, 2000). Se ha realizado intensiva investigación dedicada a la cuantificación de estas sustancias químicas, ya que su efecto antioxidante es importante para ser aplicado en el tratamiento o prevención de diferentes enfermedades. Es de gran importancia determinar los polifenoles totales debido a que son un grupo especial de antioxidantes naturales (García Martínez, Fernández Segovia, & Fuentes López, 2015).

Los compuestos fenólicos son atrapadores de radicales libres por medio de la siguiente reacción:

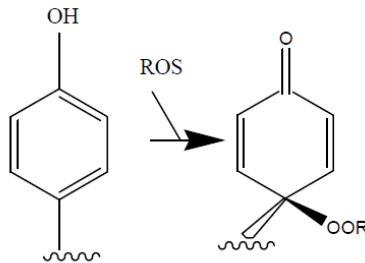


Figura 1. Reacción de oxidación del fenol a quinona.

En la figura 1, el fenol se oxida a quinona y después a peróxido (-OOR). El peróxido más sencillo es el peróxido de hidrogeno (agua oxigenada) con fórmula química H_2O_2 (HO-OH). Cuando el peróxido se forma en una biomolécula (principales en las moléculas con enlaces dobles conjugados como en los ácidos grasos), se pierde la función de dicha biomolécula y ello puede provocar daños serios en el funcionamiento de las células y los tejidos (García Martínez, Fernández Segovia, & Fuentes López, 2015).

El ácido gálico es un compuesto fenólico presente en diferentes plantas y frutas, que posee capacidad antioxidante mediante la donación de átomos de H de los grupos fenólicos a los radicales. (Roidoung, Dolan, & Muhammad, 2016) La biosíntesis del ácido gálico se da por la ruta del ácido shikimico, en donde el ácido shikimico con la acción de la enzima shikimato deshidrogenasa, genera la molécula ácido 3- deshidroshikimico para producir después por medio de una reacción redox al ácido gálico. Este ácido es de gran importancia debido a que se encuentra dentro de las estructuras de las catequinas que están en gran cantidad en el té verde.

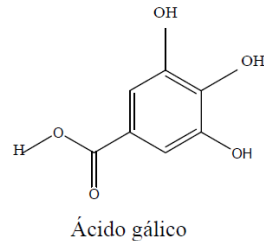


Figura 2. Estructura del ácido gálico.

El método a validar es un método colorimétrico que se basa en la determinación de polifenoles totales contenidos en productos naturales y alimentos (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, 2008). Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765nm. El reactivo de Folin Ciocalteu contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y este reacciona con los compuestos fenólicos presentes en las proteínas como la tirosina y en compuestos como ácido gálico y sus derivados. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos, da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para la cuantificación de los polifenoles totales (Figura 3) (García Martínez, Fernández Segovia, & Fuentes López, 2015).

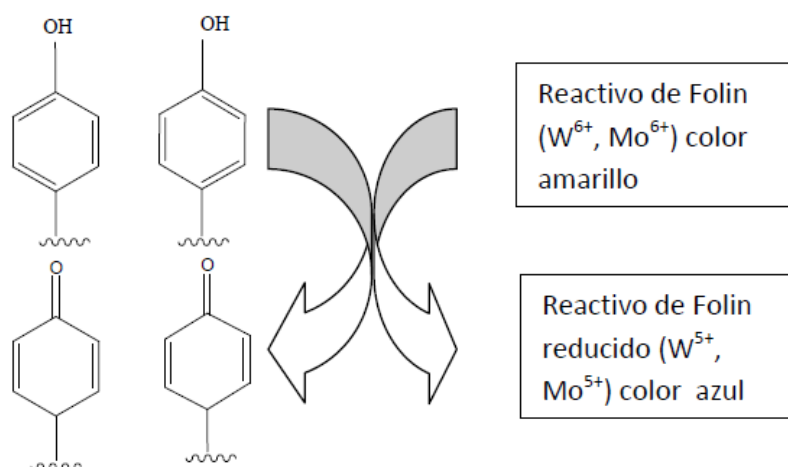


Figura 3. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu, sacado de (García Martínez, Fernández Segovia, & Fuentes López, 2015)

2.2.4. Lector de placas y análisis automatizados de alta capacidad

La cuantificación de polifenoles totales se llevará a cabo por medio un lector de placas de marca Biotek (Sinergy H1) que usa un monocromador, el cual permite hacer lecturas en formato de placas de 96 pozos en la cual la cantidad por pozo que se dispensa es de entre 200 y 300 μL , generando una reducción en el gasto de reactivos y la generación de residuos. El lector al tener monocromadores, permite trabajar con diferentes longitudes de onda de excitación o emisión (Biotek Instruments, Inc, 2015).

El equipo permite crear un ambiente adecuado según el tipo de muestra y las condiciones que se requieran, además permite controlar y verificar los niveles de CO_2 y O_2 . Asimismo, accede a examinar la temperatura y la agitación orbital según los requerimientos de la investigación. El control de estos factores permite que las investigaciones se realicen con mayor eficiencia y con un adecuado control de los parámetros que pueden influir en el desarrollo del análisis.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General

Validar el método colorimétrico Folin Ciocalteu de acuerdo a los parámetros reportados en la literatura, para la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde a través de un lector de microplacas.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar el protocolo de validación que incluya los parámetros según la literatura.
- Validar el método analítico según los parámetros de validación de la ICH Q2 R1 para la validez del método.
- Elaborar un procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización del método de Folin Ciocalteu en la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde.

2.4 METODOLOGÍA

Este proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de investigación de la Universidad Icesi y el Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ) de la facultad de ciencias naturales.

2.4.1 Extracción de la muestra

2.4.1.1. Pesar 200 mg del material vegetal contenido en las bolsas de tisana que contiene 20 gramos (elaborado por té Hindú) y adicionarlo a un tubo Eppendorf de 2 mL. Adicionar la solución de 80% de metanol y 1% de ácido clorhídrico.

2.4.1.2. Llevar al agitador orbital de marca Heidolph unimax 1010 a 200rpm por 2 horas a temperatura ambiente (25°C). Después de las 2 horas llevar a una mini centrifuga de marca Fisher Scientific por 15 min a temperatura ambiente (25 °C).

2.4.1.3. Tomar el sobrenadante y realizar la dilución de la muestra 1/350 de la siguiente manera: tomar 10 µL del sobrenadante y luego completar volumen a 3500 µl con agua destilada tipo 1.

2.4.2. Preparación de reactivos

2.4.2.1. Se preparó la solución de carbonato de sodio monohidratado de marca J.T Baker Mallinckrodt pesando 1 g de carbonato de sodio monohidratado en un vaso de precipitados, y diluirlo con 10 mL de agua destilada tipo 1.

2.4.2.2. Se preparó la solución de ácido gálico (estándar de referencia) pesando 10 mg de ácido gálico en un vaso de precipitados y diluir con 2 mL de agua destilada tipo 1 (solución stock de ácido gálico 5000 ppm).

2.4.2.3. Se preparó la solución de ácido gálico 1000 ppm tomando de la solución stock 400 µL y completar con 1600 µL de agua destilada tipo 1. Esta es la solución de ácido gálico 1000ppm.

2.4.2.4. A partir de solución de ácido gálico 1000 ppm se realizó la construcción de una curva de calibración con concentraciones de 10, 20, 50, 80 y 100 ppm.

2.4.2.5. Se realizó las matrices enriquecidas de la muestra de té verde de la siguiente manera: realizó las concentraciones conocidas de estándar de 40, 50 y 60 ppm que corresponden a los porcentajes de 80%, 100% y 120% respectivamente. De estas soluciones se tomó 10 µL de cada estándar y se adicionó a la dilución de 1 /350 de la muestra de té verde (se deben preparar 3 muestras de la misma extracción para cada uno de los placebos).

2.4.2.6. Se preparó una dilución 1:4 de reactivo de *Folin – Ciocalteu 2N* marca *Sigma- Aldrich* tomando 2500 μL del reactivo de *Folin – Ciocalteu 2N* y completar a volumen a 10 mL con agua destilada tipo 1.

2.4.3. Preparación de la microplaca



Figura 4 Microplaca después de la reacción de *Folin – Ciocalteu*.

2.4.3.1. El pozo identificado como estándar: se adicionó 25 μL de las diluciones de estándar, 100 μL de reactivo de *Folin- Ciocalteu* y 75 μL de solución de carbonato de sodio 20%.

2.4.3.2. El pozo identificado como muestra: se adicionó 25 μL de la muestra, 100 μL de reactivo de *Folin- Ciocalteu* y 75 μL de solución de carbonato de sodio 20%.

2.4.3.3. El pozo identificado como blanco: se adicionó 25 μL de agua destilada tipo 1, 100 μL de reactivo de *Folin- Ciocalteu* y 75 μL de solución de carbonato de sodio 20%.

La solución de carbonato de sodio 20 %, se adicionó 5 min después de realizar una agitación en el equipo.

2.4.4. Preparación del Equipo

2.4.4.1. Se realizó la configuración del equipo para que después de ingresar la microplaca, este realice una agitación por 5 min, expulse la microplaca para adicionar la solución de carbonato de sodio 20% y dejar a 2 horas en quietud y después de esto realizar la lectura a 765 nm (*Gutiérrez Avella, Ortiz García, & Mendoza Cisneros, 2008*). Se aseguró que el equipo se encontrará a temperatura ambiente 25 °C más o menos 2 °C.

2.4.4.2. Obtención de resultados

Después de obtener los datos del equipo, el cual nos entrega absorbancias, se procedió a realizar el análisis estadístico respectivo para obtener la curva de calibración para la regresión lineal.

2.4.5. Evaluación de datos

Se realizó una regresión lineal con la curva de calibración del estándar que permitió la obtención de una ecuación de la recta y con un análisis de varianzas (ANOVA).

$$Abs = m[x] + b$$

Ecuación 1. Ecuación de la recta

x: valor de polifenoles totales expresado en equivalentes de ácido gálico (en mg/mL).

y: valor de la absorbancia.

m: pendiente de la recta

b: intercepto con el eje y

La fórmula para la obtención de los equivalentes másicos en ácido gálico es:

$$[x] = \frac{y - b}{m}$$

Ecuación 2 Ecuación para hallar los equivalentes de ácido gálico

La x representa la cantidad de polifenoles totales equivalentes másicos en ácido gálico en mg/mL (Rodríguez Luna, Universidad Politécnica de Catalunya Barcelona, 2008).

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Validación del método de Folin – Ciocalteu

Con los datos obtenidos en el lector de microplaca se realizó un análisis estadístico para determinar la validez del método.

2.5.1.1. Linealidad

Los datos usados (ver anexo 1) para este parámetro se toman de la curva de calibración del estándar (grafico 1). En donde se pueden observar con el r que teóricamente debe ser 1 para un comportamiento lineal. Sin embargo, se procede a realizar un análisis estadístico para confirmar que el comportamiento lineal de los datos obtenidos.

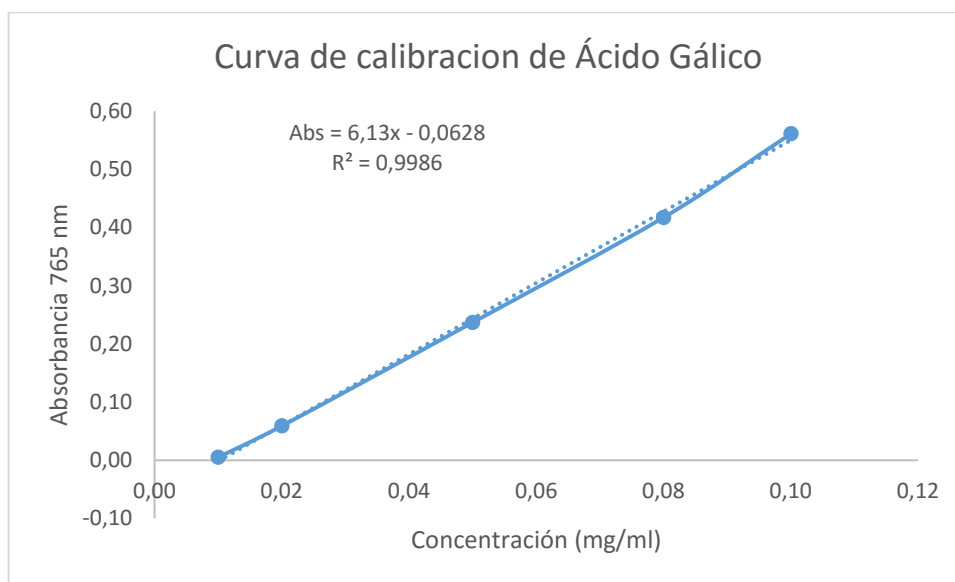


Grafico 1. Curva de calibración del estándar.

La prueba estadística que se llevó a cabo fue un análisis de varianzas (ANOVA) que es una prueba de hipótesis para comparar varias medias y evaluar la importancia de uno o más factores en diversas situaciones. Con esta prueba se quiere comprobar qué tan lineal es la curva de calibración, es decir que se posea un coeficiente de determinación (R^2), que en la ecuación regresión lineal nos explica la relación entre dos variables con un nivel de confianza dado. Para determinar esto se tuvo en cuenta el siguiente razonamiento: si $F_{\text{Calculado}}$ es mayor que el F_{Tabulado}

con una confianza del 95 % se rechaza la hipótesis nula y hay relación lineal entre las variables.

De igual manera, se realizaron los criterios de los intervalos de confianza tanto para la pendiente como para el intercepto, en donde se realizaba la prueba t en donde se obtenía un $t_{\text{calculado}}$ y un t_{tabulado} . Para evaluar si la pendiente toma o no valores de cero y si el método responde a los cambios de concentración y de igual manera observar si el intercepto incluye o no el cero por tanto el método es proporcional o no en el intervalo en que se realiza el ensayo.

2.5.1.2 Precisión

Para el desarrollo de este parámetro, se tuvo en cuenta los datos del estándar a una concentración de 50 ppm equivalentes al 100%. Con los datos obtenidos se evaluó la desviación estándar relativa (%RSD) para determinar la repetibilidad y la precisión intermedia.

Precisión intermedia y Repetibilidad			
Analista 1		Analista 2	
N° lecturas	Absorbancia	N° lecturas	Absorbancia
1	0,214	1	0,221
2	0,219	2	0,220
3	0,219	3	0,221
4	0,214	4	0,221
5	0,219	5	0,221
6	0,219	6	0,220
7	0,212	7	0,220
8	0,217	8	0,220
9	0,213	9	0,230
10	0,217	10	0,230
Promedio	0,216	Promedio	0,222
Desviación estándar	0,002791	Desviación estándar	0,00403
%RSD	1,29	%RSD	1,81

Tabla 1 Datos obtenidos para precisión intermedia y repetibilidad

En este parámetro se tuvo en cuenta como criterio de aceptación que el valor del %RSD no debe ser mayor al 2% para cada ensayo, (Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI), 2001) afirmando la cercanía de la coincidencia entre las mediciones obtenidas bajo las condiciones de los laboratorios de productos naturales cumplimiento así el parámetro de precisión.

2.5.1.3 Exactitud

La exactitud del método se investigó por medio del porcentaje de recuperación, tomando como datos las matrices enriquecidas (ver anexo 1), la preparación de la dilución de la muestra y posteriormente cargado con estándares de concentraciones conocidas de 80, 100 y 120 %. Después, se realizaron las lecturas respectivas para obtener como datos experimentales las absorbancias de estas muestras.

Estadísticamente, se llevó a cabo el test de Cochran, es un test que permite comparar varianzas entre poblaciones normales, pero se circunscribe al caso de que todas las clases sean de igual tamaño, resultando especialmente útil para detectar si alguna varianza es mucho mayor que las restantes, se planteó una hipótesis de varianzas equivalentes, en la que el dato experimental debe ser menor a un dato teórico (0,3093), encontrado a partir de la tabla para el test Cochran con un número de réplicas de 5. (Mongay Fernández, 2005) A partir de estos datos se obtuvieron 3 varianzas de las 3 concentraciones evaluadas.

Concentración	Absorbancia	Concentración hallada (mg/ml)	Varianza	Recuperación (%)
80	0,246	6,66109434	0,000281	99,47
	0,262	6,67709434		99,24
	0,282	6,69709434		98,94
	0,281	6,69609434		98,95
	0,285	6,70009434		98,90
100	0,229	6,64409434	0,000909	99,73
	0,260	6,67509434		99,27
	0,301	6,71609434		98,66
	0,297	6,71209434		98,72
	0,306	6,72109434		98,59
	0,292	6,70709434		98,79
120	0,274	6,68909434	0,000357	99,06
	0,289	6,70409434		98,84
	0,304	6,71909434		98,62
	0,283	6,69809434		98,93
	0,253	6,66809434		99,37
Gexp	0,309314368	Criterio de aceptación	Media	99,00
Gtabla	0,7457		Desviación estándar	0,33
			CV	0,33

Tabla 2 Datos experimentales del ácido gálico para evaluar la exactitud y criterio de aceptación

Observando los datos encontrados se puede concluir que hay varianzas equivalentes, por lo tanto, la concentración no influye en la variabilidad de los resultados aceptando la hipótesis planteada con la prueba de Cochran, reconociendo de esta manera el parámetro de exactitud para la metodología.

De igual manera, se realizó el cálculo del porcentaje de recuperación media del método que resultó ser del 99,00% de recuperación, el cual es un resultado satisfactorio encontrándose dentro del rango del criterio de aceptación. Es decir, el método posee la exactitud necesaria para ser considerado en la cuantificación de los polifenoles totales en el té verde.

2.5.1.4. Límite de detección y cuantificación

Como ICH expresa, estos parámetros son necesarios en métodos en donde se realicen análisis que estén destinados a la evaluación de impurezas o trazas. En este caso, se decidió realizarlos para determinar hasta qué punto se puede contar con datos que tengan una alta credibilidad. Para el cálculo estadístico de los límites de detección y cuantificación se tuvieron en cuenta puntos por debajo de la curva de calibración del estándar.

Concentración (ppm)	Absorbancia	Promedio absorbancia	Desviación estándar
5	0,008	0,0073333333	0,0011547
	0,006		
	0,008		
7	0,012	0,0096666667	0,00208167
	0,008		
	0,009		
9	0,023	0,022	0,001
	0,021		
	0,022		

Tabla 3 Datos para la determinación de los límites de detección y cuantificación

A partir de la ecuación 4 y la ecuación 5 se calcularon los límites de detección y cuantificación, en donde CL es la concentración de analito en el límite de cuantificación o detección, k es un constante que es 10 para el límite de cuantificación y 3 para el límite de detección, S_{bt} desviación estándar correspondiente a la señal del estándar y b la pendiente de la curva de calibración.

$$CL = \frac{k \times S_{bt}}{b}$$

Ecuación 3 Determinación de límites de cuantificación y detección

$$CL = \frac{3 \times S_{bt}}{b}$$

Ecuación 4 Límite de detección

$$CL = \frac{10 \times S_{bt}}{b}$$

Ecuación 5 Límite de cuantificación

Obteniendo como resultado los siguientes límites:

Límite de detección	2,789 ppm
Límite de cuantificación	4,644 ppm

Tabla 4 Límite de cuantificación y límite de detección

Con lo anterior, se puede observar que el límite de detección es de 2,789 ppm. Esto indica que el método puede detectar el analito de una manera confiable y exacta hasta dicho valor. El límite de cuantificación es de 4,644 ppm, indicando que a esa concentración el método puede a cuantificar el analito con una precisión y exactitud adecuada.

Además de la realización de todos los parámetros de validación, se retó al método a realizar una lectura de diferentes tipos de té verde y en diferentes presentaciones (capsulas, té líquidos comerciales, bolsas de té) en donde se puede observar los resultados (Anexo 1) observando que los te líquidos comerciales poseen una menor cantidad de polifenoles totales debido a que su absorbancia está muy por debajo de la dilución de la extracción de la muestra.

3. CONCLUSIONES

Se realizó el protocolo de validación del método analítico para la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde por el método colorimétrico Folin – Ciocalteu, con el cual se pueden desarrollar futuras mediciones de polifenoles totales en el Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ).

Después de llevar a cabo la experimentación del método de Folin – Ciocalteu en el Laboratorio de investigación de productos naturales y en el Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ), por medio del lector de microplacas, se obtuvieron datos que fueron evaluados para comprobar que el método para la cuantificación de polifenoles totales en una matriz alimenticia como lo es el té verde cumple con los parámetros de validación como lo son: la linealidad, precisión, exactitud, rango, selectividad y límite de detección y cuantificación bajo condiciones establecidas. De esta manera, se cumplió con la validación del método para que éste brinde datos confiables y exactos.

Se elaboró el procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización del método de Folin Ciocalteu en la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde. El objetivo de este POE es que el personal a cargo del Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ), además de los estudiantes de la electiva validación de métodos analíticos y a quien corresponda, pueda realizar la utilización correcta del método.

Además, como valor agregado, se realizó el POE del software Galeno que tiene la Universidad Icesi, que es altamente empleado para la validación de matrices farmacológicas en la industria.

4. RECOMENDACIONES

Se recomienda al analista que va desarrollar el método tener un buen manejo de la micropipeta, ya que al no tomar un volumen correcto se pueden generar cambios significativos en los datos. La utilización de la micropipeta multicanal genera valores más exactos y precisos. Es importante tener en cuenta que debido a que son volúmenes demasiado pequeños se pueden generar errores muy significativos.

Además el analista debe tener un entrenamiento previo de la utilización de la micropipeta, para así no generar errores.

El método validado debe seguirse tal como está en el Procedimiento operativo estándar (POE) cualquier cambio que se genere, conlleva a una nueva validación.

Bebidas de té en general realizar análisis, en donde se hizo ensayos para observar la cantidad de polifenoles totales.

Ampliar el estudio a más bebidas de té o tisanas y tisanas de importación.

5. REFERENCIAS

- Alvarez Jaramillo, J. B. (2011). Analisis de la industria del té. Bogotá: Universidad del Rosario.
- Alvarez Jaramillo, J., Botero Riveros, D., & Suarez Daza, R. (2011). Analisis de la industria del té. Bogotá: Universidad del Rosario.
- Álvarez Jaramillo, J., Riveros, B., & Suárez Daza, R. (2011). Análisis de la industria del té. Bogotá: Universidad del Rosario.
- Asociacion Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI). (2001). Validación de metodos análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. En *Validación de metodos analíticos* (págs. 17-86). España: AEFI.
- Biotek Instruments, Inc.* (11 de Noviembre de 2015). Recuperado el 24 de abril de 2014, de http://www.biotek.es/es/products/microplate_detection/synergyh1_hybrid_m_ultimode_microplate_reader.html
- Chung S. Yang, X. W. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer*, 429-439.
- Chung S. Yang, X. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and humans relevance . *Nature Review Cancer* , 429-439.
- García Martínez, E. F. (2015). Determinacion de polifenoles Totales porel metodo de Folin - Ciocalteu. *Universitat Politecnica de Valencia. Escuela Tecnica Superior de Ingenieria agronómicay del medio Natural* , 1-9.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., & Fuentes López. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural - Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural* , 1-9.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinacion del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo de Folin- Ciocalteu. *Determinacion del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo de Folin- Ciocalteu*. Recuperado el 07 de 11 de 2015
- Gutiérrez Avella, D. M., Ortiz García, C. A., & Mendoza Cisneros, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para alimentacion animal. *Centro Nacional de Metrología*, 220-1108(1-5).


- ICH. (1994). *ICH Q2 R1: ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE "VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY"*.
- ICONTEC. (2005). *NTC-ISO 17025*. Bogotá: ICONTEC.
- Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. (2008). *Portalantioxidantes.com*. Obtenido de Portalantioxidantes.com: <http://www.portalantioxidantes.com/analisis-de-antioxidantes/>
- Instituto de Salud Pública Chile. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". *Instituto de Salud Pública Chile*, 21.
- INVIMA. (1995). *Decreto 677*. Bogotá: INVIMA.
- Mongay Fernández, C. (2005). Análisis de Varinzas. En C. Mongay Fernández, *Quimiometría* (pág. 131). España: Universitat de València.
- Quiñones, M. M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 76-89.
- Rodríguez Luna, M. (2008). *Universidad Politécnica de Catalunya Barcelona*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2015, de http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/6647/02_Mem%C3%B2ria.pdf?sequence=13&isAllowed=y
- Rodríguez Luna, M. (2008). *Universidad Politécnica de Catalunya Barcelona*. Recuperado el 27 de Febrero de 2016, de http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/6647/02_Mem%C3%B2ria.pdf?sequence=13&isAllowed=y
- Rodríguez-Amado, J. R., Escalona-Arranz, J. C., & Rodríguez-Romerol, R. (2011). Validación del método de cuantificación de polifenoles en el extracto de fluido de *Tamarindus indica* L. *Revista Cubana de Química*, 42-50.
- Roidoung, S., Dolan, K. D., & Muhammad, S. (2016). Gallic acid as a protective antioxidant against anthocyanin degradation and color loss in vitamin-C fortified cranberry juice. *EL SEVIER*, 422-427.
- Sabu M Chacko, P. T. (2010). Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine*, 1 - 9 .
- Sis, P. (5 de Junio de 2015). *Rincón del Té*. Obtenido de <http://te.aceitedearganweb.com/te-verde-propiedades-beneficios/>

Uchenna J. Unachukwu, S. A. (2010). White and Green Teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): Variation in Phenolic, Methylxanthine, and Antioxidant Profiles. *Journal of Food Science*, 541-548.

Velásquez, C. (2000). Papel de las especies reactivas del oxígeno en la arterioesclerosis. *Universidad de Antioquia*.

6. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de validación del método analítico para la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde por el método colorimétrico Folin - Ciocalteu

	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN PRODUCTOS ELABORADOS CON TÉ VERDE POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO FOLIN-CIOCALTEU	NUMERO: LAF-001-01
		FECHA DE EMISIÓN:

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
NOMBRE: Catalina Urbano Rojas	NOMBRE: Guillermo León Montoya	NOMBRE: Claudia Patricia Marín Espinosa
FIRMA:	FIRMA:	FIRMA:
CARGO: Estudiante de Química Farmacéutica	CARGO: Director de proyecto de grado	CARGO: Directora de proyecto de grado
FECHA:	FECHA:	FECHA:

1. Objetivo

1.1 Validar un método colorimétrico a través de un lector placas para la cuantificación de polifenoles en productos elaborados con té verde.

2. Alcance

2.1 Este procedimiento está dirigido a los profesores de Control Microbiológico y Físicoquímico y Validación de Métodos Analíticos, profesores del Laboratorio de Productos Naturales y personal a cargo del Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ).

3. Antecedentes

La industria del té ha ido tomando fuerza en el mundo catalogando a dicha bebida como una de las más populares a nivel mundial; además, su cadena operativa ha sido susceptible a innovación por parte de las compañías más importantes del

sector como lo son Hindú, Jaibel, entre otras. Lo anterior se da por los beneficios que dicha bebida contribuye al ser humano; entre ellas está su capacidad antioxidante, la prevención del envejecimiento celular (Alvarez Jaramillo, Botero Riveros, & Suarez Daza, 2011) y la prevención de cáncer (Chung S.Yang, 2009).

El método de Folin Ciocalteu es un método colorimétrico que se basa en la determinación de polifenoles totales contenidos en productos naturales y alimentos. Químicamente, se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm (García Martínez E. F., 2015).

4. Responsabilidad y autoridad

4.1 Profesores a cargo del Laboratorio de Productos Naturales.

4.2 Profesores a cargo de los Laboratorios de Control Microbiológico y Físicoquímico y Validación de Métodos Analíticos.

4.3 Personal a cargo del Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ)

5. Definiciones

5.1. *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.

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

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

5.4. *Aparato*: Equipo sin la capacidad de realizar mediciones, destinado a ejecutar funciones como calentamiento, agitar, evaporar.

5.5. *Equipo*: Todo material, dispositivo, aparato, patrón instrumento y material de referencia usado en la realización de las medidas necesarias para llevar un ensayo o calibración.

5.6. *Instrumento*: Equipo destinado a la realización de medidas.

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

5.8. *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.

5.9. *Placebo*: Muestra a estudiar sin principio activo.

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

5.11 *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.

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

5.13 *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.

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

5.15 *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.

5.16 *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

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

5.18 *Lector de placas*: también conocido como lector de microplacas, es un instrumento de laboratorio que permite detectar eventos biológicos, químicos o físicos en muestras contenidas en placas. Son muy utilizadas en investigación, descubrimiento de fármacos, validación de ensayos y control de calidad, entre otros.

5.19 *Reactivo de Folin - Ciocalteu*: es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usando para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos.

6. Parámetros a evaluar durante la validación

- 6.1. *Selectividad*: Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.
- 6.2. *Exactitud*: Proximidad entre los datos o resultados obtenidos experimentalmente y un valor verdadero o aceptado como valor de referencia.
- 6.3. *Precisión*: Expresa la concordancia entre una serie de medidas obtenidas de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas. Es decir, capacidad del método para proporcionar resultados próximos entre sí.
- 6.4. *Precisión intermedia*: Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (aparatos, reactivos, analistas).
- 6.5. *Linealidad*: Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.
- 6.6. *Repetibilidad del instrumento*: se calcula a partir de mediciones repetidas realizadas a una muestra homogénea que ha pasado por todo el proceso de método, es decir, realizar mediciones a la misma muestra como tal y no réplicas de ella. El número de mediciones en este ensayo está condicionado por la cantidad de muestra que destruye el equipo en su determinación. Se recomienda de 6 a 10 veces.
- 6.7. *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 ICH 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 Corporal-Gautier
- 6.8. *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.
- 6.9. *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

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 y por debajo de las rodillas. Pantalón largo.

- Guantes de nitrilo
- Gafas de seguridad
- Zapatos cerrados: suela antideslizante

7.2 Materiales

Material	Cantidad
Micropipeta 1000 uL	1
Micropipeta 200 uL	1
Micropipeta 20 uL	1
Micropipeta multicanal 100 uL	1
Espátula	1
Matraz 5 mL	10
Matraz 10 mL	2
Matraz 20 mL	1
Microplacas de pozos de fondo plano	7

7.3 Reactivos

Reactivo	Cantidad
Carbonato de sodio monohidratado	1g
Ácido clorhídrico	70 mL
Metanol	20 mL
Estándar de ácido gálico (material de referencia)	10 mg
Reactivo de Folin Ciocalteu 2N	2 mL
Té verde (material vegetal de las bolsitas)	200 mg

7.4 Equipos

Equipo	Cantidad
Mini centrífuga	1
Agitador orbital	1
Lector de microplacas	1
Campana de extracción	1

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 polifenoles totales en té verde.

9. Procedimiento

9.1 Extracción de la muestra

9.1.1 Pesar 200 mg del material vegetal (té Hindú) y adicionarlos a un tubo Eppendorf de 2 mL.

9.1.2 Adicionar al tubo Eppendorf 2 mL de la solución de 80% de metanol y 1% de ácido clorhídrico.

9.1.3 Llevar al agitador orbital a 200 rpm por 2 horas, a temperatura ambiente (25°C). Después de las 2 horas, llevar a centrifuga por 15 min.

9.1.4 Tomar el sobrenadante y realizar la dilución de la muestra 1/350 de la siguiente manera: tomar 10 µl del sobrenadante y luego completar volumen a 3500 µl con agua destilada tipo 1.

9.2 Durante el tiempo de las dos horas en curso del ítem 9.1 proceder a preparar los reactivos. **Ver a continuación**

9.2.1 **Solución de carbonato de sodio 20 %:** Pesar 1 g de carbonato de sodio monohidratado en un vaso de precipitados, y diluir con 10 mL de agua destilada tipo 1.

9.2.2 **Solución de Acido Gálico (estándar):** Pesar 10 mg de ácido gálico en un vaso de precipitados y diluir con 2 mL de agua destilada tipo 1 (solución ácido gálico 5000 ppm). Rotular como solución stock.

9.2.2.1. Tomar de la solución stock, 400 μ l y completar con 1600 μ l de agua destilada tipo 1. Esta es la solución de 1000 ppm.

9.2.2.2 Realizar las diluciones 10, 20, 50, 80 y 100 ppm a partir de la solución de 1000 ppm de la siguiente manera: tomar de la solución de 1000 ppm los siguientes volúmenes 20 μ l, 40 μ l, 100 μ l, 160 μ l y 200 μ l respectivamente, después completar a un volumen de 2 mL cada una de las diluciones con agua destilada tipo 1.

9.2.2.3 Realizar los placebos cargados de la muestra de té verde de la siguiente manera: realizar las concentraciones conocidas de estándar de 40, 50 y 60 ppm que corresponden a los porcentajes de 80%, 100% y 120% respectivamente. De estas diluciones se toma 10 μ l de cada estándar y se adiciona a la dilución de 1 /350 de la muestra de té verde (se deben preparar 3 muestras de la misma extracción para cada uno de los placebos).

9.2.3 **Reactivo de Folin – Ciocalteu:** Preparar 10 mL de una dilución de 1:4 reactivo de Folin – Ciocalteu 2N agua destilada tipo 1. Así: Tomar 2500 μ l del reactivo de Folin – Ciocalteu 2N y completar a volumen con agua destilada tipo 1.

9.3 Preparación de la microplaca y equipo

9.3.1 Identificar cada pozo del plato con las diferentes diluciones de ácido gálico, muestra, y blanco.

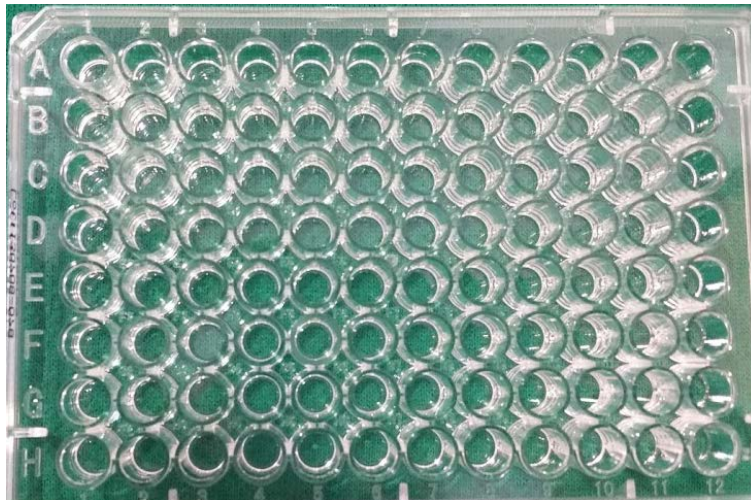


Figura 4 Microplaca de 96 pozos

9.3.2 Tomar 25 μ l de cada una de las diluciones de ácido gálico con la micropipeta multicanal de volumen de 100 μ l (realizar 6 repeticiones).

9.3.3 Tomar 25 μ l de agua destilada tipo 1 con la micropipeta multicanal de volumen de 100 μ l y adicionarlo al pozo que se ha identificado como blanco.

9.3.4 Tomar 25 uL de las diluciones de muestra (extracción de té verde) con la micropipeta multicanal de volumen de 100µl.

9.3.5 Tomar 100 uL de reactivo de Folin – Ciocalteu 0,5 N con la micropipeta multicanal de volumen de 100µl y adicionarlos a todos los pozos.

9.3.6 Preparar el lector de microplacas para leer 765 nm, con la temperatura del cuarto (25 °C) e introducir la microplaca al plato del lector.

9.3.8 Programar el lector de microplacas para que agite por 5 min, pasado este tiempo, adicionar 75 uL de la solución de carbonato de sodio 20 % a todos los pozos utilizados con la micropipeta multicanal de volumen de 100 µl y colocar en agitación nuevamente por 1 min y se deja en reposo por 2 horas.

9.3.9 Pasadas las dos horas agitar por 1 min y luego realizar la lectura a 765 nm.

9.4 Parámetros de validación

9.4.1 **Exactitud:** Se calcula por medio del porcentaje de recuperación.

9.4.1.1 Lectura de placebo a tres concentraciones

9.4.1.1.1 Tomar de la muestra diluida del extracto de té verde que se realizó en el ítem 9.1 y realizar la lectura de las muestras a 765 nm y además realizar las lecturas de los placebos cargados realizados en el ítem 9.2.2.3.

9.4.2 Lectura de estándar:

9.4.2.1 Realizar la preparación del estándar como en el ítem 9.2.2.2 y realizar la lectura a 765 nm.

9.5 Precisión

9.5.1 Precisión del sistema.

9.5.1.1. Lectura de estándar: realizar una vez por analista 1

9.5.1.1.2 Realizar la preparación de la solución ácido gálico a 1000 ppm y realizar la dilución de 50 ppm como en el ítem 9.2.2.2 y realizar la lectura 10 veces.

9.5.2 Precisión del método.

9.5.2.1 Se deben realizar 6 lecturas de cada estándar (ácido gálico) de 10ppm, 20ppm, 50ppm, 80ppm, 100ppm a partir de una solución de 1000 ppm.

9.5.2.2 Estándar:

9.5.2.2.1 Repetir los pasos del ítem 9.5.1.1.

9.5.3. Precisión intermedia:

9.5.3.1. Se realiza por un analista diferente el mismo día.

9.5.3.2. Realizar la preparación de la solución ácido gálico a 1000 ppm y realizar la dilución de 50 ppm como en el ítem 9.2.2.2 y realizar la lectura 10 veces.

9.5.3.4. Estándar:

9.5.3.4.1 Repetir los pasos del ítem **9.5.2.2** (ítem anterior).

9.6 Linealidad

9.6.1 Linealidad del sistema

9.6.1.1 Se realizar en ausencia de placebo, se debe realizar una curva de calibración del estándar (ácido gálico) de 10ppm, 20ppm, 50ppm, 80ppm, 100ppm a partir de una solución de 1000 ppm.

9.7 Limite detección y cuantificación

9.7.1 Se evalúa mediante la elaboración de una curva de calibración de tres niveles por debajo de la curva de calibración del estándar, estas concentraciones son: 5ppm, 7ppm y 9ppm y se preparan de la siguiente manera: tomar un volumen de 80 µl, 100 µl y 120 µl respectivamente de la solución de 1000 ppm y completar a 2mL de volumen con agua destilada tipo 1.

10. Evaluación de los datos

Realizar una regresión lineal que permita la obtención de una ecuación de la recta.

$$y = mx + b$$

Ecuación 6. Ecuación de la recta

x: valor de polifenoles totales expresado en equivalentes de ácido gálico (en mg/ml).

y: valor de la absorbancia.

m: pendiente de la recta

b: intercepto con el eje y

La fórmula para la obtención de los equivalentes máxicos en ácido gálico es:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

La x corresponde a la cantidad de polifenoles totales equivalentes másicos en ácido gálico en mg/ml (Rodriguez Luna, Universidad Politecnica de Catalunya Barcelona, 2008).

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	% DE DISCREPANCIA: La diferencia de los resultados del placebo enriquecido o solo no puede superar al 2%.	
	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 o por consecuencia de degradación de este principio activo.	
	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 o generarse durante el almacenamiento o la vida útil del producto	
PRECISIÓN	PRECISIÓN DEL METODO	El %RSD de las determinaciones a nivel bajo, medio y alto no es mayor a 2,0%. Los porcentajes hallados en el nivel 100% deben estar entre 95 – 105%
	PRECISIÓN INTERMEDIA	El %RSD de las determinaciones al nivel 100% para cada analista no es mayor a 2,0%. Los porcentajes hallados al nivel 100% para cada analista deben estar entre 95 – 105%.
EXACTITUD	El Promedio de porcentajes de recuperación a cada nivel no son menores a 95% y no mayores a 105%. RSD de las Recuperaciones a cada nivel no es mayor a 2,0%.	
LINEALIDAD	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. De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA):	

	<p>PRUEBA PARA LA REGRESIÓN 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>INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE 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>INTERVALOS DE CONFIANZA PARA EL INTERCEPTO 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>
<p>REPETIBILIDAD</p>	<p>Repetibilidad del método: Se acepta como preciso el método sí el CV es menor a 2%</p> $CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$
<p>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCION</p>	$CL = \frac{k \times S_{bt}}{b}$ <p>CL: Concentración de analito en el límite de cuantificación</p> <p>k: Constante que usualmente se considera 10 para límite de cuantificación y 3 para el límite de detección</p> <p>S_{bt}: Desviación estándar correspondiente a la señal de las lecturas</p> <p>b: Pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración de analito. El rango de esta recta tiene que ser cercana en la concentración a los niveles límite de cuantificación.</p>

12. Referencias

- Álvarez Jaramillo, J., Riveros, B., & Suárez Daza, R. (2011). Análisis de la industria del té. Bogotá: Universidad del Rosario.
- Asociacion Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI). (2001). Validación de metodos analisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. En *Validación de metodos analíticos* (págs. 17-86). España: AEFI.
- Chung S.Yang, X. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and humans relevance . *Nature Review Cancer* , 429-439.
- García Martínez, E. F. (2015). Determinacion de polifenoles Totales porel metodo de Folin - Ciocalteu. *Universitat Politecnica de Valencia. Escuela Tecnica Superior de Ingenieria agrónomicay del medio Natural* , 1-9.
- Rodriguez Luna, M. (2008). *Universidad Politecnica de Catalunya Barcelona*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2015, de http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/6647/02_Mem%C3%B2ria.pdf?sequence=13&isAllowed=y

13. Resultados.

Datos de linealidad.

Concentracion %	Cantidad (mg) mtra pesado	% Valoracion hallado	Absorbancia	Cantidad ²	Absorbancia ²	Cantidad * Absorbancia
		X	Y	X ²	Y ²	XY
10,00	10,8	0,01	0	0,00	0,00000	0,00000
10,00	10,8	0,01	0,008	0,00	0,00006	0,00008
10,00	10,8	0,01	0,006	0,00	0,00004	0,00006
10,00	10,8	0,01	0,005	0,00	0,00003	0,00005
10,00	10,8	0,01	0,007	0,00	0,00005	0,00007
20,00	10,8	0,02	0,07	0,00	0,00490	0,00140
20,00	10,8	0,02	0,059	0,00	0,00348	0,00118
20,00	10,8	0,02	0,05	0,00	0,00250	0,00100
20,00	10,8	0,02	0,058	0,00	0,00336	0,00116
20,00	10,8	0,02	0,058	0,00	0,00336	0,00116
50,00	10,8	0,05	0,24	0,00	0,05760	0,01200
50,00	10,8	0,05	0,239	0,00	0,05712	0,01195
50,00	10,8	0,05	0,245	0,00	0,06003	0,01225
50,00	10,8	0,05	0,251	0,00	0,06300	0,01255
50,00	10,8	0,05	0,21	0,00	0,04410	0,01050
80,00	10,8	0,08	0,405	0,01	0,16403	0,03240
80,00	10,8	0,08	0,393	0,01	0,15445	0,03144
80,00	10,8	0,08	0,413	0,01	0,17057	0,03304
80,00	10,8	0,08	0,451	0,01	0,20340	0,03608
80,00	10,8	0,08	0,425	0,01	0,18063	0,03400
100,00	10,8	0,10	0,52	0,01	0,27040	0,05200
100,00	10,8	0,10	0,55	0,01	0,30250	0,05500
100,00	10,8	0,10	0,573	0,01	0,32833	0,05730
100,00	10,8	0,10	0,588	0,01	0,34574	0,05880
100,00	10,8	0,10	0,575	0,01	0,33063	0,05750
Promedio Nivel I	10,80	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
Promedio Nivel II	10,80	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00
Promedio Nivel III	10,80	0,05	0,24	0,00	0,06	0,01
Promedio Nivel IV	10,80	0,08	0,42	0,01	0,17	0,03
Promedio Nivel V	10,80	0,10	0,56	0,01	0,32	0,06
Sumatorias		0,26	1,28	0,02	0,55	0,10
Sumatorias al cuadrado		0,07	1,64	0,00	0,30	0,01
Pendiente de la Recta		6,130000000	Intercepto	-0,0628000000	Desviacion STD(Sb)	0,30
n =		5,00	niveles (10,20,50,80 y 100)		Desviacion STD(Sa)	0,02
SSexplicada		0,22	r	0,9962	n-2	3,00
SStotal		0,22	r2	0,9925	S²_{x,y} (varianza residual)	0,00
SSinexplicada		0,00	a	-0,06		
Analisis de Varianza(ANOVA)						
FUENTE DE VARIACION		SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS DEL ERROR	ESTADISTICO F CALCULADO	ESTADISTICO F TABULADO
Regresion Lineal		Explicada	1,00	0,22	434,14	6,59
Residual		Inexplicada	3,00	0,00		
Total		Total	4,00			
alfa		0,05				

Datos de límite de cuantificación y detección

Conc %	ppm (Xi)	Respuesta (Yi)	$X_i Y_i$	X_i^2	Y_i^2		
100	5,0000	0,008	0,0400	25,0	0,000064		
100	5,0000	0,006	0,0300	25,0	0,000036	SUM (Xi)	63,00
100	5,0000	0,008	0,0400	25,0	0,000064	SUM (Yi)	0,12
140	7,0000	0,012	0,0840	49,0	0,000144	SUM (Xi Yi)	0,91
140	7,0000	0,008	0,0560	49,0	0,000064	SUM (Xi ²)	465,00
140	7,0000	0,009	0,0630	49,0	0,000081	SUM (Yi ²)	0,00
180	9,0000	0,023	0,2070	81,0	0,000529	N =	9,00
180	9,0000	0,021	0,1890	81,0	0,000441		
180	9,0000	0,022	0,1980	81,0	0,000484		

Concentración Analito en muestra Test: 2,86E-06 mg/mL

Concentración en ppm (100%) 0,0050 mg/mL 5,00 ppm

Pendiente de la recta 0,004

Inter.del blanco, a_{blanco} 0,013

Datos de Calibración de Desv. Std de Respuestas de Sensibilidad

Conc (Xi)	Desv Std (Yi)	$X_i Y_i$	X_i^2	Y_i^2		
5,0000	0,0012	0,0058	25,0000	0,00000133	SUM (Xi)	21,00
7,0000	0,0021	0,0146	49,0000	0,00000433	SUM (Yi)	0,00
9,0000	0,0010	0,0090	81,0000	0,00000100	SUM (Xi Yi)	0,03
					SUM (Xi ²)	155,00
					SUM (Yi ²)	0,00
					N =	3,00

Pendiente de la recta 0,000

Inter.del blanco, S_{blanco} 0,002


CONCLUSIÓN

EL LÍMITE DE DETECCIÓN ES	2,7894 ppm	2,79E-03 mg/mL	97631,2458 %
EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN ES	4,6443 ppm	4,64E-03 mg/mL	162552,2851 %

Muestras	Absorbancia	Porcentaje (Acido Galico)	Concentración hallada (ppm)	Dilución
te verde la teresita	0,041	3,00427E-06	8,584	
	0,042	3,00427E-06	8,585	
	0,045	3,00427E-06	8,588	
	0,044	3,00427E-06	8,587	
	0,047	3,00427E-06	8,590	
	0,049	3,00427E-06	8,592	
te verde fuerte oriental	0,037	3,00427E-06	8,580	
	0,036	3,00427E-06	8,579	
	0,038	3,00427E-06	8,581	
	0,038	3,00427E-06	8,581	
	0,042	3,00427E-06	8,585	
te verde viella	0,036	3,00427E-06	8,579	1/350
	0,055	3,00427E-06	8,598	
	0,057	3,00427E-06	8,600	
	0,061	3,00427E-06	8,604	
	0,065	3,00427E-06	8,608	
	0,068	3,00427E-06	8,611	
te verde con flor de jamaica oriental	0,062	3,00427E-06	8,605	
	0,055	3,00427E-06	8,598	
	0,06	3,00427E-06	8,603	
	0,056	3,00427E-06	8,599	
	0,059	3,00427E-06	8,602	
	0,056	3,00427E-06	8,599	
	0,057	3,00427E-06	8,600	
te verde con jengibre oriental	0,041	3,00427E-06	8,584	
	0,039	3,00427E-06	8,582	
	0,041	3,00427E-06	8,584	
	0,04	3,00427E-06	8,583	
	0,04	3,00427E-06	8,583	
	0,039	3,00427E-06	8,582	
	0,041	3,00427E-06	8,584	

Muestras	Absorbancia	Porcentaje (Acido Gálico)	Concentración hallada (ppm)	Dilución
te verde con menta lipton	0,104	3,00427E-06	8,647	1/350
	0,111	3,00427E-06	8,654	
	0,107	3,00427E-06	8,650	
	0,108	3,00427E-06	8,651	
	0,107	3,00427E-06	8,650	
	0,108	3,00427E-06	8,651	
te limon lipton liquido	0,04	0,004291318	8,583	1/50
	0,037	0,004291318	8,580	
	0,037	0,004291318	8,580	
	0,039	0,004291318	8,582	
	0,042	0,004291318	8,585	
	0,043	0,004291318	8,586	
te mr tea con teavigo liquido	0,04	0,004291318	8,583	1/50
	0,046	0,004291318	8,589	
	0,051	0,004291318	8,594	
	0,036	0,004291318	8,579	
	0,045	0,004291318	8,588	
	0,047	0,004291318	8,590	
Capsula de te verde funat	0,416	0,000896	8,959	1/500
	0,475	0,000896	9,018	
	0,487	0,000896	9,030	
	0,471	0,000896	9,014	
	0,459	0,000896	9,002	
	0,482	0,000896	9,025	

Anexo 2. Procedimiento operativo estándar (POE) de la utilización del método de Folin Ciocalteu en la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde

 <p>Facultad de Ciencias Naturales</p>	PROCEDIMIENTO	NUMERO: POE-016-01
	Procedimiento para la utilización del método de Folin - Ciocalteu en la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde.	PÁGINA: 50 de 65
		FECHA EMISIÓN: 25- May-2016

PREPARADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
NOMBRE: Catalina Urbano Rojas	NOMBRE: Guillermo León Montoya	NOMBRE: Claudia Patricia Marín Espinosa
FIRMA:	FIRMA:	FIRMA:
CARGO: Estudiante de Química Farmacéutica	CARGO: Director del proyecto de grado	CARGO: Directora del proyecto de grado
FECHA: 25-May-2016	FECHA: 25-May-2016	FECHA: 25-May-2016

1. Objetivo

- 1.1. Describir todos los pasos para realizar la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde.

2. Alcance

- 2.1 Este procedimiento está dirigido al analista de control de calidad, jefe de Laboratorio y personal del Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ).

3. Responsabilidad y autoridad

3.1 El analista debe seguir paso a paso las instrucciones detalladas en el procedimiento, emitir un resultado y el concepto de conforme o no conforme

3.2 El Jefe de Laboratorios y jefe del LIQ tiene la autoridad para verificar que este procedimiento se cumpla y emitir el concepto final.

4. Definiciones

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

4.2. *Instrumento:* Equipo destinado a la realización de medidas.

4.3. *Lector de placas:* también conocido como lector de microplacas, es un instrumento de laboratorio que permite detectar eventos biológicos, químicos o físicos en muestras contenidas en placas. Son muy utilizadas en investigación, descubrimiento de fármacos, validación de ensayos y control de calidad, entre otros.

4.4. *Reactivo de Folin - Ciocalteu:* es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usando para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos.

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

5. Materiales y equipos

5.1. Elementos de higiene y seguridad

- Uniforme completamente limpio
- Bata de laboratorio (antifluido) por debajo de las rodillas
- Gafas de seguridad
- Guantes de nitrilo
- Zapatos cerrados: suela antideslizante

5.2. Equipos y elementos

Reactivos	Cantidad
Metanol	10 mL
Carbonato de sodio monohidratado	1g
Ácido clorhídrico	10 mL
Estándar de Ácido Gálico	10 mg
Reactivo de Folin – Ciocalteu 2N	2 mL
Té verde (material vegetal bolsitas)	200 mg
Agua destilada tipo 1	500 mL

Equipos	Cantidad
Mini centrífuga	1
Agitador orbital	1
Lector de microplacas	1
Campana de extracción	1

Materiales	Cantidad
Micropipeta 1000 uL	1
Micropipeta 200 uL	1
Micropipeta 20 uL	1
Micropipeta multicanal 100 uL	1
Espátula	1

Tubo eppendor de 1,5 mL	3
Puntas para las micropipetas (azules y amarillas)	1 bolsa de cada una
Vaso de precipitado 5 mL	9
Vaso de precipitado 10 mL	2
Vaso de precipitado 20 mL	1
Microplacas de pozos de fondo plano	1

6. DESCRIPCION DEL PROCESO

6.1. Consideraciones generales

- 6.1.1 Se debe utilizar gafas de seguridad durante el análisis.
- 6.1.2 Los datos primarios tales como, pesos, volúmenes y cálculos aritméticos se deben registrar en el cuaderno de laboratorio.
- 6.1.3 Los resultados finales se deben registrar en el Certificado de Análisis que se encuentra en el sistema, el cual debe ser diligenciado en su totalidad.
- 6.1.4 El Certificado de Análisis de Producto terminado se debe anexar al informe que se entrega al jefe del laboratorio.

6.2. Procedimiento para la cuantificación de polifenoles totales en el té verde.

- 6.3. *Extracción de la muestra:* Se debe pesar 200 mg del material vegetal (bolsas de tisana) y adicionarlo al tubo Eppendorf de 1.5 mL y adicionar la solución de 80 % de metanol y 1 % de ácido clorhídrico. En las siguientes proporciones tomar de metanol 1200 µl y de ácido clorhídrico 41 µl y completar volumen con 259 µl de agua destilada tipo 1.

6.3.1. Llevar el tubo Eppendorf al agitador orbital a 200 rpm por 2 horas, a temperatura ambiente (25°C). Después de las 2 horas llevar a centrifuga por 15 min con temperatura ambiente (25°C).

6.3.2. Para preparar la muestra que se debe adicionar se debe seguir los siguientes pasos:

6.3.2.1. Tomar 10 μ l del sobrenadante del ítem 6.3.1 y adicionarle 3490 μ l de agua destilada tipo 1 para completar un volumen final de 3500 μ l.

6.4. *Solución de ácido gálico:* Pesar 10 mg del estándar de ácido gálico y adicionar 2 la micropipeta de 1000 μ l de agua destilada tipo 1 rotular la solución como la solución stock de 5000ppm

6.4.1. A partir de la solución stock realizar una de solución de 1000 ppm tomando 400 μ l y completar volumen con 2mL con agua destilada tipo 1. Con la solución anterior de 1000 ppm y realizar las diluciones de 10, 20, 50, 80, y 100 ppm de la siguiente manera: tomar de la solución de 1000 ppm los siguientes volúmenes 20 μ l, 40 μ l, 100 μ l, 160 μ l y 200 μ l respectivamente, después completar a un volumen de 2 mL cada una de las diluciones con agua destilada tipo 1.

Nota: recuerde que el volumen final debe ser 2 mL por esta razón se debe restar a este volumen final el volumen tomado de la solución de 1000 ppm y así obtener el volumen de agua que se debe adicionar.

6.5. *Reactivo de Folin – Ciocalteu:* preparar una solución 1:4 de reactivo de Folin – Ciocalteu de la siguiente manera tomar 2mL del reactivo de Folin – Ciocalteu de concentración 2N y completar volumen con 6 mL de agua destilada tipo 1y obtener de esta manera un volumen final de 8 mL

6.6. *Solución de carbonato de sodio 20 %:* Pesar 1 g de carbonato de sodio monohidratado y adicionarle 10 mL de agua destilada tipo 1.

6.7. *Cuantificación por medio del lector de microplacas:*

6.7.1. Se debe realizar la identificación de los pozos de la microplaca como blanco, muestra y diluciones del estándar. (observar la figura 1)

Nota: La identificación de los pozos es a elección.

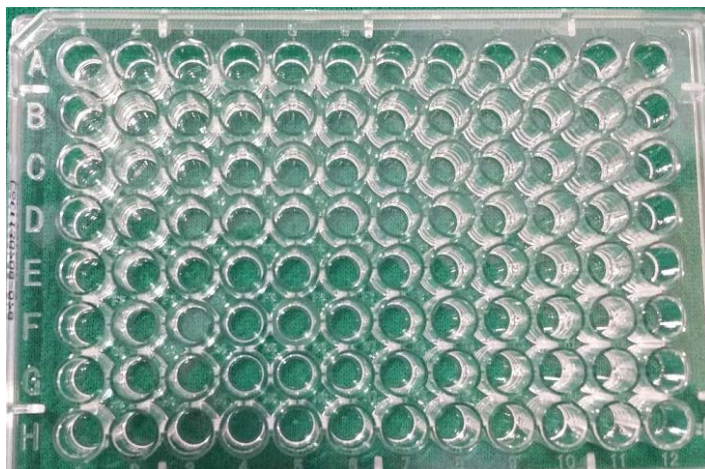


Figura 4 microplaca de 96 pozos

- 6.7.2. En los pozos se debe adicionar las siguientes proporciones de las soluciones preparadas en los ítems anteriores:
- 6.7.3. *Pozo identificado como blanco:* Adicionar 25 μ l de agua destilada tipo 1, luego adicionar 100 μ l de reactivo de Folin – Ciocalteu y por ultimo 75 μ l de la solución de carbonato de sodio 20%.
- 6.7.4. *Pozo identificado como muestra:* adicionar 25 μ l de la muestra preparada en el ítem 6.3, luego adicionar 100 μ l de reactivo de Folin – Ciocalteu y por ultimo 75 μ l de la solución de carbonato de sodio 20%.
- 6.7.5. *Pozo identificado como estándar:* adicionar 25 μ l de cada uno de los estándares preparados en el ítem 6.4, luego adicionar 100 μ l de reactivo de Folin – Ciocalteu y por ultimo 75 μ l de la solución de carbonato de sodio 20%

Nota: La adición de la solución carbonato de sodio al 20 % se debe adicionar después de 5 minutos en que la microplaca estará en agitación en el equipo. Después se agita por un 1 min y se deja reposar por 2 horas, pasadas las 2 horas se realizar la lectura a 765 nm.

7. DISTRIBUCIÓN

El presente documento se distribuye según los responsables definidos.

8. REFERENCIAS

Documento No. LAF-001-01 Protocolo de validación del método analítico para la cuantificación de polifenoles totales en productos elaborados con té verde por el método colorimétrico Folin - Ciocalteu.

Anexo 3. Procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización del software Galeno

 Facultad de Ciencias Naturales	PROCEDIMIENTO	NUMERO: POE-016-02
	Procedimiento para del software Galeno	PÁGINA: 56 de 65
		FECHA EMISIÓN: 25- May-2016

PREPARADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
NOMBRE: Catalina Urbano Rojas	NOMBRE: Guillermo León Montoya	NOMBRE: Claudia Patricia Marín Espinosa
FIRMA:	FIRMA:	FIRMA:
CARGO: Estudiante de Química Farmacéutica	CARGO: Director del proyecto de grado	CARGO: Directora del proyecto de grado
FECHA: 25-May-2016	FECHA: 25-May-2016	FECHA: 25-May-2016

1. Objetivo

1.1. Describir todos los pasos para realizar del ingreso de datos al software Galeno

2. Alcance

2.1. Este procedimiento está dirigido al analista de Control de Calidad, jefe de laboratorio, los profesores de Validación de Métodos Analíticos y personal del laboratorio de instrumentación química (LIQ).

3. Responsabilidad y autoridad

3.1 El analista debe seguir paso a paso las instrucciones detalladas en el procedimiento, emitir un resultado y el concepto de conforme o no conforme

3.2 El Jefe de Laboratorios, jefe del LIQ y los profesores de Validación de Métodos Analíticos tiene la autoridad para verificar que este procedimiento se cumpla y emitir el concepto final.

4. Definiciones

4.1 GALENO: Software empleado en validación de técnicas analíticas que permite a través de los datos iniciales de ensayos experimentales, efectuar todas las pruebas estadísticas correspondientes que necesita la validación. *Instrumento:* Equipo destinado a la realización de medidas.

5. Materiales y equipos

5.2. Software Galeno

6. DESCRIPCION DEL PROCESO

6.1 Ingreso de información de validación al software Galeno

6.1.5 Ingresar al software de galeno con el usuario y su contraseña correspondiente.

6.1.6 Para el ingreso de datos de la validación de la metodología analítica en el software Galeno, dirigirse a la pestaña de módulos en la ventana principal. Figura 1

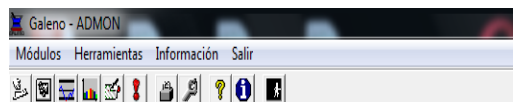


Figura 5 Ventana principal del Galeno

6.1.7 En la pestaña de módulos dirigirse a la opción de validación de técnicas analíticas y seleccionarlo.

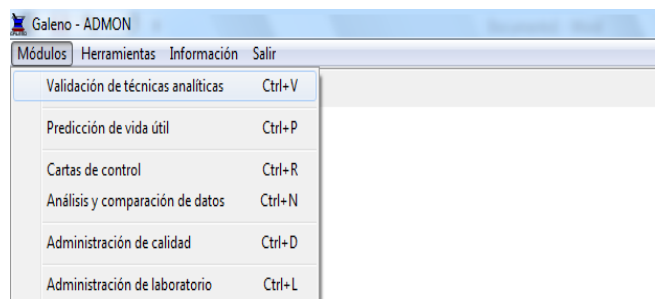


Figura 6 Ventana principal del Galeno

- 6.1.8 Posteriormente aparece la ventana de la figura 3, en donde se ingresa toda la información correspondiente a las condiciones de análisis de cada uno de los parámetros evaluados durante el proceso experimental de la validación.


Estudio	dd/mm/aaaa	
NB AcetJa161	29/04/2016	
Producto	Presentación	Empaque Primario
5 ACETAMINOFEN 150MG/SML	4 FRASCO 60 ML	4 FRASCO
Motivo de Estudio	Linealidad del Sistema * Conc. Replicas	Linealidad del Metodo * Conc. Replicas
4 ELECTIVA VMA	3 X 3	3 X 3
Límites de D y C * Conc. Replicas	Precisión del Sistema * Conc. Replicas	Exactitud * Conc. Replicas
3 X 3	3 X 6	3 X 3
Precisión del método * Conc. Replicas	Robustez Parametros Variables	Unidades de medida Parametro
3 X 3	7 X 2	LINEALIDAD
Analistas Periodos	Muestras Lecturas	EXACTITUD
2 2	2 2	
Observaciones y conclusiones		

Figura 7 Ventana de estudios para la validación de técnicas analíticas

- 6.1.9 Inicialmente se debe dar nombre al estudio generado correspondiente a la validación, la presentación y el empaque primario en el que se encuentra. Además, especificar el motivo de la validación.
- 6.1.10 La siguiente información se ingresa de acuerdo al Protocolo de Validación de metodología de análisis realizado.
- 6.1.11 Posteriormente se debe ingresar el número de concentraciones y repeticiones de las mediciones que se realizaron al analizar las muestras para cada uno de los parámetros.
Nota. Para el parámetro de precisión del sistema se debe realizar como mínimo 6 repeticiones.
- 6.1.12 Para los parámetros de linealidad, precisión y se debe completar la información para el sistema y el método, teniendo en cuenta el procedimiento aplicado para la validación.
- 6.1.13 De igual manera se ingresa la información para los parámetros de límite de detección y cuantificación teniendo en cuenta el procedimiento aplicado en la validación.
- 6.1.14 El parámetro de robustez, se dejan con los datos por defecto del software.

6.2. Evaluación de los parámetros de validación

- 6.2.1 Una vez ya se han ingresado los datos correctamente, de las concentraciones y las réplicas trabajadas, se debe proceder a digitar los resultados encontrados.

6.2.2. Para poder registrar correctamente los resultados obtenidos se debe ingresar desde el botón de Datos iniciales  que se encuentra en parte inferior derecha de la ventana de estudios para la validación.

6.2.3. Luego de hacer clic en este botón, seguir con el proceso para seleccionar el parámetro de estudio, que aparecen en la siguiente ventana.

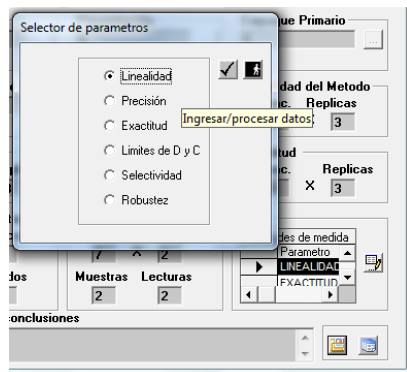




Figura 8 Ventana de selección de parámetros

Nota. El siguiente proceso se debe realizar para cada uno de los parámetros

6.3 Linealidad del sistema

6.3.1. Seleccionar el parámetro de la linealidad y posteriormente dar clic en el botón de ingresar/procesar datos . Posteriormente, seleccionar el ítem Del sistema y nuevamente se continua con el botón de ingresar/procesar datos .

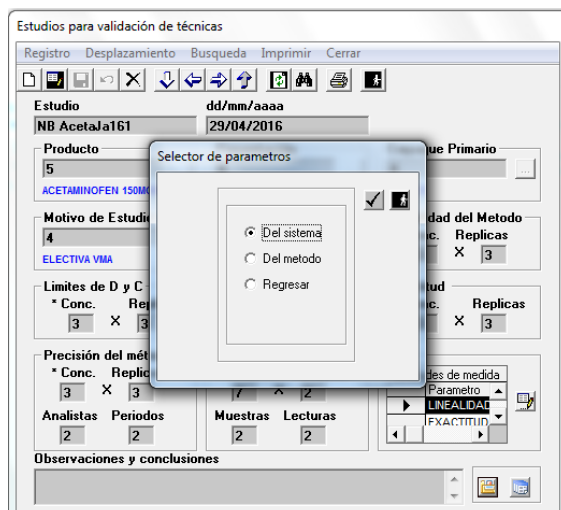


Figura 9 Ventana de selección específica del parámetro de linealidad

6.3.2. Una vez terminado eso, aparecerá la siguiente ventana. En esta ventana se podrán ingresar todos los datos recolectados de las lecturas realizadas con los estándares, en la validación para la linealidad del sistema.

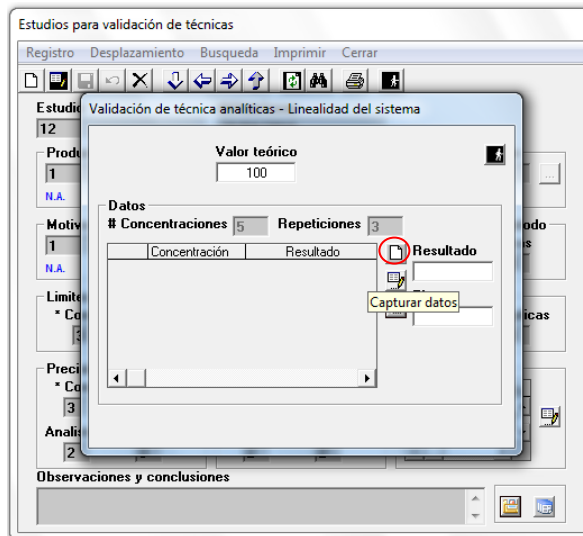


Figura 10 Ventana para ingreso de datos

6.3.3 Dar clic en el botón de capturar datos . Este abrirá una nueva ventana para ingresar las concentraciones que se trabajaron en la validación.



Figura 11 Ventana para ingresar datos de concentración

6.3.4. Una vez hemos ingresado la columna de las concentraciones, finalmente procedemos a ingresar el resultado obtenido para cada replica de cada concentración, como se muestra en la siguiente figura.

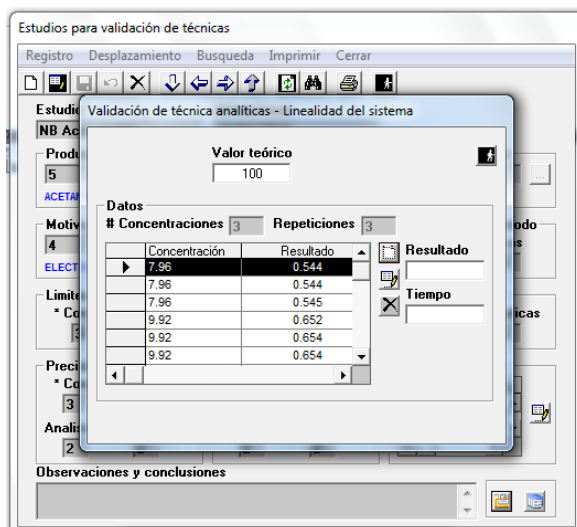


Figura 12 Ventana para ingreso de resultados

6.4. Linealidad del método

6.4.1 Este proceso debe ser el mismo que para la linealidad del sistema, pero en este caso se debe seleccionar en todas las ventanas “Del método”. Siguiendo los numerales 6.3.1 a 6.3.4

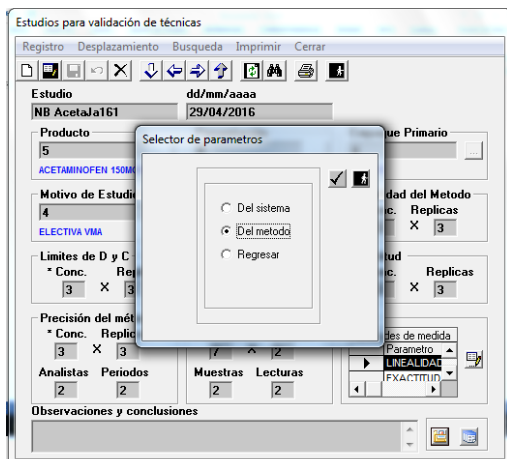


Figura 13 Ventana para selección específica del parámetro de linealidad

6.4.2 Una vez terminado lo del ítem anterior, aparecerá la siguiente ventana. Ingresar todos los datos recolectados de las lecturas realizadas con los placebos, en la validación para la linealidad del método.

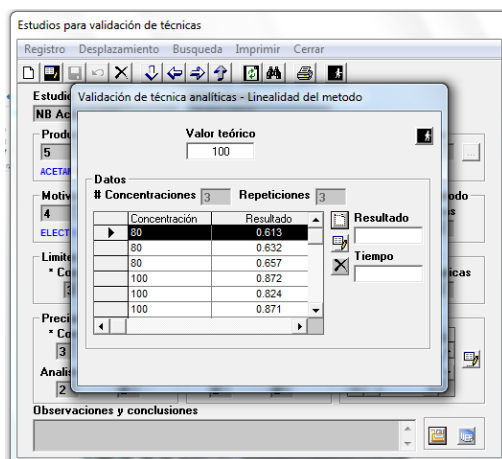


Figura 14 Ventana para ingreso de datos

6.5 Precisión del sistema

6.5.1. Este parámetro se realiza de la misma manera que la linealidad del método y del sistema, solo que se debe seleccionar el parámetro de la precisión y posteriormente dar clic en el botón de ingresar/procesar datos . Posteriormente, seleccionar el ítem Del sistema y nuevamente se continua con el botón de ingresar/procesar datos .

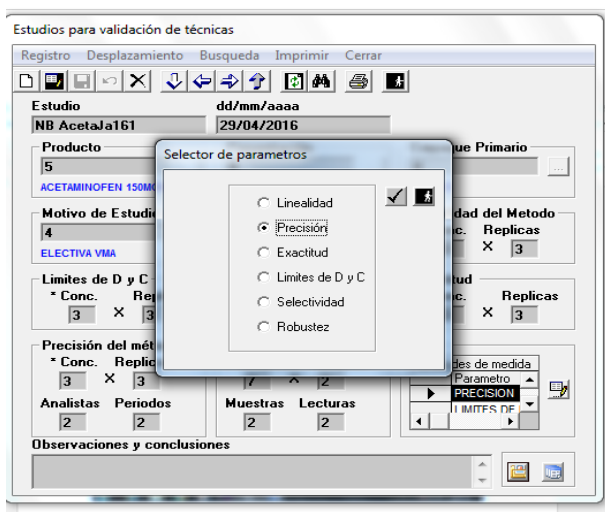


Figura 15 Ventana de la selección de parámetros parámetro de precisión

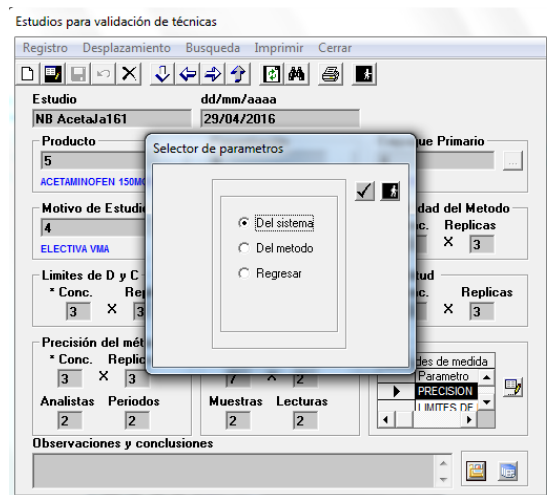


Figura 16 Ventana para selección específica del parámetro de precisión

6.5.2. Al aparecer la ventana de ingreso de datos como en la figura 13

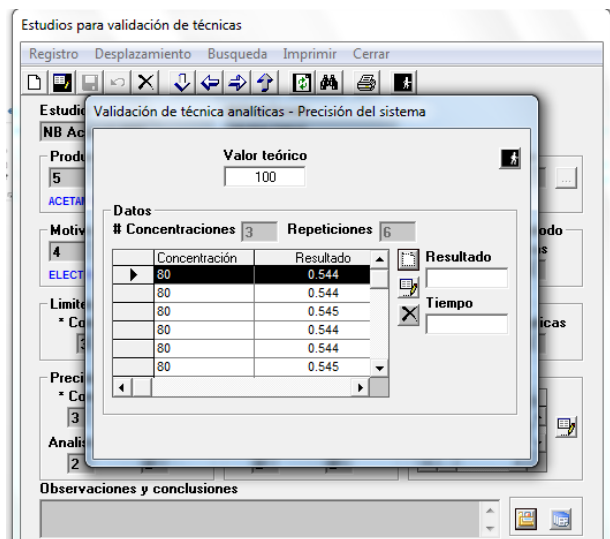


Figura 17 Ventana de ingreso de datos de precisión

6.6 Exactitud

6.6.1 Se realiza el ingreso de la misma forma de los ítems anteriores solo se debe seleccionar el parámetro de la exactitud y posteriormente dar clic en el botón de ingresar/procesar datos .




Figura 14 Ventana parámetro de exactitud



Figura 15 Ventana de Registro de datos exactitud

6.7. Después de terminar el ingreso de los datos se realizar lo siguiente para ver los resultados estadísticos que galeno procesa de la validación

6.7.1 Dar clic en el botón Reportes e indicadores . Que se encuentra en la parte inferior derecha figura 16

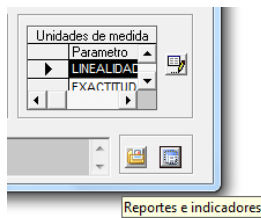


Figura 18 Ventana de reportes e indicadores

6.7.2. Posteriormente seleccionar el parámetro al que se quiere observar el análisis estadístico similar a la figura 14

6.7.3. Después del paso anterior, aparece la siguiente ventana, Elegir el método utilizado en la validación y el informe que desea del parámetro elegido y dar hacer clic en el icono .

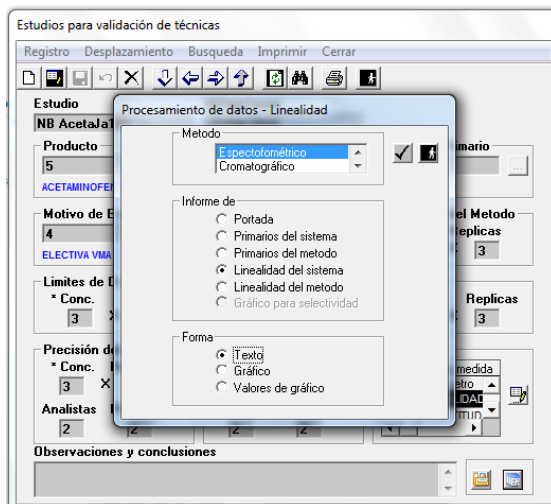



Figura 19 Ventana de análisis estadístico

6.7.4 Finalmente aparecerá el reporte de los resultados. Hacer clic en el botón , Guardar en el computador, seleccionando las opciones de exportación de la figura 18 opciones de exportan y guardando la documentación con el respectivo nombre.

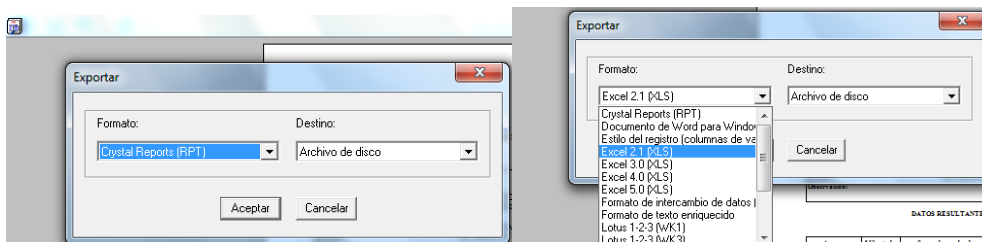


Figura 20 Opciones de exportación y guardado de información

7 DISTRIBUCIÓN

El presente documento se distribuye según los responsables definidos.

8 REFERENCIAS

Manual general de GALENO.

Estudiantes de la electiva de validación de método analítico.