

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



CUANTIFICACION POR HPLC-DAD DE CAFEINA Y TRIGONELINA EN *Coffea arabica* L Y ESCOPOLETINA EN *Persea schiedeana* Ness.

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PASANTIA DE INVESTIGACION

PRESENTADO POR

MONICA YEREMY FUENTES LEIVA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2023

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS BENITEZ

**SECRETARIO GENERAL**

INGENIERO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

**SECRETARIA**

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

**DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO**

**DIRECTORA GENERAL**

M.Sc. Ena Edith Herrera Salazar

**TRIBUNAL EVALUADOR**

**ASESORA DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS  
NATURALES:**

M.Sc. Ana Miriam Santamaría de Campos

**ASESORA DE AREA EN CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS  
FARMACÉUTICOS, COSMÉTICOS Y VETERINARIOS:**

PhD. Guadalupe del Carmen Abrego Escobar

**INVESTIGADOR TITULAR:**

Lic. Ulises Oswaldo Guardado Castillo

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi tutor, Lic. Ulises Guardado, por dirigirme durante este trabajo de graduación, por brindarme su tiempo y apoyarme, gracias por su confianza y sobre todo, gracias por su orientación, por igual agradezco a todos y cada uno de los docentes del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Dr. Marvin José Núñez Rivas, MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, MsD. Ana Miriam Santamaría de Campos e Ing. Sergio Maravilla, gracias por su paciencia, por compartir sus conocimientos, y gracias por su dedicación, todos forman parte de mi formación y dondequiera que vaya, los llevare conmigo en mi futuro profesional. Agradezco a MSc. Ena Edith Herrera Salazar y a Dra. Guadalupe del Carmen Abrego Escobar, por ser fundamentales durante este proceso, gracias por su ayuda, gracias por su tiempo y paciencia, y gracias por todas las observaciones realizadas y su plena colaboración.

Agradezco a mis padres, por ser mi pilar en la vida, quienes han estado a mi lado en cada etapa y por ser siempre mis mejores guías de vida. Gracias por ser quienes son y por creer en mí.

Agradezco a mis abuelos, gracias a ustedes por el apoyo, por la paciencia brindada, por sus consejos y principalmente gracias por su amor incondicional.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio, gracias por todo el apoyo, el compañerismo, las aventuras y las horas de trabajo que compartimos juntos.

Y primordialmente, le doy gracias a Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por brindarme fortaleza y una vida llena de aprendizajes.

## DEDICATORIA

A mis padres, Edgar Fuentes y Camila Leiva, por haberme forjado en la persona que soy hoy en día, por enseñarme a ser valiente y luchar por mis sueños, todo lo que he logrado ha sido por ustedes, que me han apoyado incondicionalmente, gracias infinitamente por inspirarme, ha sido por su trabajo, sacrificio, amor y confianza que hoy estoy acá.

A mis abuelitos, les dedico este trabajo también, ustedes que son un ejemplo de amor puro para mí, por siempre mostrarme bondad y darme fuerzas. Gracias por todo lo que he aprendido de ustedes.

A mis amigas, primas y hermanas, por estar conmigo en mis momentos felices, y mis momentos difíciles, por siempre salvarme y sobre todo por sostenerme.

A mi mejor amigo, Israel Vidal, un beso hasta el cielo.

*“Breathe in,  
Breathe through,  
Breathe deep,  
breathe out.”*

## INDICE GENERAL

Pág. N°

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 Introducción xiv

CAPITULO II

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo General

2.2 Objetivos Específicos

CAPITULO III

3.0 Marco teórico

3.1 Generalidades de las plantas 20

3.2 Metabolitos secundarios 22

3.3 Purificación y aislamiento de metabolitos en plantas 26

3.4 Especies vegetales de estudio 27

3.6 Desarrollo de métodos analíticos 32

CAPITULO IV

4.0 Diseño metodológico

4.1 Tipo de estudio 38

4.2 Investigación de campo 39

4.3 Parte experimental 42

## CAPITULO V

### 5.0 Resultados y discusión de resultados

- 5.1 Selección y recolección de especies vegetales de *Persea schiedeana* Ness. 53
- 5.2 Descripción del método analítico a desarrollar para cuantificación de escopoletina en *Persea schiedeana* Ness. 56
- 5.3 Verificación de parámetros de validación para metodología analítica de cuantificación de escopoletina en *P. schiedeana* Ness. 58
- 5.4 Cuantificación del metabolito secundario de escopoletina en *Persea schiedeana* Ness. 67
- 5.5 Selección y recolección de especie vegetal de *Coffea arabica* L. 70
- 5.6 Preparación de infusiones de *C. arabica* L. 72
- 5.7 Descripción del método analítico para cuantificación de cafeína y trigonelina en *Coffea arabica* L. 72
- 5.8 Verificación de parámetros de validación en metodología analítica para cuantificar cafeína y trigonelina en *C. arabica* L. 73
- 5.9 Cuantificación de los metabolitos secundarios de cafeína y trigonelina en *C. arabica* L. 86

## CAPITULO VI

- 6.0 Conclusiones 90

## CAPITULO VII

- 7.0 Recomendaciones 93

## BIBLIOGRAFÍA

## ANEXOS

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Clasificación de Alcaloides según su origen.	24
2	Clasificación de Cumarinas según su estructura.	26
3	Regiones cafetaleras de El Salvador	30
4	Preparación de extractos acuoso de hojas de <i>P. schiedeana</i> Ness.	54
5	Curva de calibración para evaluación del parámetro de desempeño de linealidad	61
6	“Café” tostado de variedad Bourbon.	71
7	Molienda de “Café” tostado.	71
8	Preparación y filtración de extractos de <i>C. arabica</i> L.	72
9	Curva de calibración de la linealidad de cafeína.	75
10	Curva de calibración para linealidad de trigonelina.	82
11	Esquema de trabajo con <i>P. schiedeana</i> Ness	101
12	Curva de calibración para cuantificación de escopoletina.	102
13	Elaboración de fase móvil.	103
14	Esquema de trabajo con <i>C. arabica</i> L.	104
15	Curva de calibración para cuantificación de cafeína y trigonelina	105
16	Cromatogramas de extracto etanólico de hojas de <i>P. schiedeana</i> Ness	107
17	Cromatogramas de muestras de granos tostados de <i>C. arabica</i> L.	113



## INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Clasificación de drogas vegetales según su naturaleza química.	21
2	Relación organoléptica de los compuestos químicos presentes en el café.	31
3	Medidas de expresión de Precisión.	34
4	Especies vegetales de flora salvadoreña seleccionadas recolectadas	40
5	Datos de Recolección de <i>Persea schiedeana</i> Nees "Shucte".	41
6	Datos de Recolección de <i>C. arabica</i> L. Elaboración propia.	41
7	Datos obtenidos de los rendimientos de extractos de <i>P. schiedeana</i> Ness realizados	55
8	Condiciones cromatográficas de análisis por HPLC-DAD.	58
9	Datos de regresión lineal de parámetro de linealidad.	59
10	Análisis de Varianza.	60
11	Resultados de la evaluación para linealidad de método.	61
12	Resultados del parámetro de desempeño de exactitud.	64
13	Resultados de Repetibilidad.	65
14	Resultados de precisión intermedia.	66
15	Resultados de los parámetros para límite de detección y cuantificación	67
16	Datos obtenidos de las muestras de <i>P. schiedeana</i> Ness.	68
17	Condiciones cromatográficas de análisis por HPLC-DAD.	73
18	Datos de regresión lineal de parámetro de linealidad.	74
19	Análisis de Varianza.	75

20	Resultados de la evaluación para linealidad de método de cafeína.	76
21	Resultados de exactitud para cafeína.	77
22	Resultados de repetibilidad para cafeína.	78
23	Resultados de precisión intermedia para cafeína.	79
24	Resultados de los parámetros para límite de detección y cuantificación de cafeína	80
25	Datos de regresión lineal de parámetro de linealidad.	81
26	Análisis de Varianza.	81
27	Resultados de la evaluación para linealidad de método.	82
28	Resultados de exactitud para trigonelina.	84
29	Resultados de repetibilidad para trigonelina.	84
30	Resultados de precisión intermedia para trigonelina.	85
31	Resultados de los parámetros para límite de detección y cuantificación de trigonelina	86
32	Cantidad de cafeína y trigonelina determinada por HPLD-DAD	87
33	Material, equipos y reactivos a utilizados en laboratorio de investigación de productos naturales.	100
34	Parámetros a determinar en validación de métodos analíticos	106

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

- 1 Material, equipos y reactivos a utilizados en laboratorio de investigación de productos naturales
- 2 Esquema de trabajo de parte experimental con especie vegetal *P. schiedeana* Ness
- 3 Preparación de curva de calibración para cuantificación de escopoletina
- 4 Preparación de Fase móvil
- 5 Esquema de trabajo de parte experimental con especie vegetal *C. arabica* L
- 6 Preparación de curva de calibración para cuantificación de cafeína y trigonelina
- 7 Parámetros a determinar en validación de métodos analíticos
- 8 Cromatogramas de extracto etanólico de hojas de *P. schiedeana* Ness
- 9 Certificado de análisis de estándar de escopoletina.
- 10 Cálculo para cuantificación de escopoletina.
- 11 Certificado de análisis de estándar de cafeína.
- 12 Certificado de análisis de estándar de trigonelina.
- 13 Cálculo para cuantificar contenido de cafeína en infusión de granos de café tostado de *Coffea arabica* L.

## RESUMEN

Esta investigación versa sobre el estudio de cuantificación de metabolitos secundarios, escopoletina en *Persea schiedeana* Ness, y cafeína y trigonelina en *Coffea arabica* L. Para conseguir este propósito, se llevó a cabo la recolección de dos especies vegetales de la flora salvadoreña seleccionadas, y fueron identificadas por un botánico experto.

Se llevó a cabo la extracción por el método de maceración y decocción, con hojas y corteza de *P. schiedeana* Ness, utilizando diferentes solventes de extracción, luego, se eliminó el solvente para obtener los extractos secos. Se desarrollo una metodología analítica mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, acoplada a un arreglo de diodos, y se determinaron los parámetros de validación, utilizando la guía de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), los resultados de la verificación del método mostraron valores que cumplieron los criterios de aceptación de los parámetros evaluados. Posteriormente, se procedió a la cuantificación, y según los resultados obtenidos ( $4.8792-5.079 \pm 0.0075$  mg/100 g de hoja seca), fue el extracto etanólico de hojas, quien presento mayor cantidad del metabolito secundario de escopoletina.

Con *Coffea arabica* L, se llevo a cabo la metodología analítica, y posteriormente se verifico los parámetros de validación, se comprobó que cada criterio de aceptación fue cumplido, por lo que el método es útil para su propósito empleado. Seguido de esto, se cuantifico las infusiones de "Café". Y con los resultados obtenidos, se encuentra el contenido de cafeína, entre los rangos de 0.612-0.660% y se comparó con los límites mínimos permitidos por el Reglamento Técnico Salvadoreño, que es de 0.4% sobre base seca de "Café", y para trigonelina los rangos obtenidos fueron entre 0.601-0.712%, que se encuentran entre los rangos conocidos para la especie Arabica, que oscilan entre 0.6-1.3%.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

Desde la antigüedad, el ser humano ha utilizado las plantas para tratar y/o curar diferentes padecimientos. El amplio espectro de actividades farmacológicas de las plantas se debe a los metabolitos secundarios que son multiblanco macromoleculares específicos, es decir, que pueden interaccionar con las proteínas, las membranas celulares y ácidos nucleicos debido a la presencia de grupos funcionales con pares de electrones libres como los carbonilos, hidroxilos y amino. Además, existe un creciente interés en la industria farmacéutica de productos fitoterapéuticos, que empieza su camino a la innovación y desarrollo tecnológico. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, diversas investigaciones han sido orientadas al desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la cuantificación de metabolitos secundarios, puesto que son indispensables para la formulación, control y aseguramiento de calidad de fitofármacos a base de especies vegetales. En este sentido, este trabajo versa sobre trabajar un método de cuantificación de cafeína y trigonelina, de acuerdo al método descrito (López Bóbeda, 2008), por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) en una muestra de "Café" (*Coffea arabica* L, Rubiaceae) de la variedad Bourbon, además, desarrollar el método de cuantificación de escopoletina por HPLC-DAD en 3 extractos (acuoso, etanólico y hexánico) de dos órganos de la especie vegetal "Shucte" (*Persea schiedeana* Ness, Lauraceae). En ambas metodologías analíticas, se llevó a cabo la verificación de los parámetros de validación, mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales proporcionada por la Guía de Armonización de la Conferencia Internacional (ICH Q2), y se obtuvieron datos para la determinación de los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección, cuantificación y

selectividad. Cuyo cumplimiento fue necesario para verificar que el método analítico es apto para el propósito establecido.

En la especie vegetal *Persea schiedeana* Ness (Lauraceae), se han realizado estudios previos, en el que se determinó su propiedad analgésica y antiinflamatoria, se demostró que los extractos de las hojas de *P. schiedeana* Ness tienen buena actividad antiinflamatoria relacionada con la inhibición de prostaglandina y esto se relaciona principalmente con la presencia de escopoletina. Validando la importancia etnobotánica de esta especie vegetal como una alternativa terapéutica para tratar el dolor y la inflamación. Convirtiendo el metabolito y especie vegetal de importancia para la industria farmacéutica. Al realizar la cuantificación de escopoletina, en los diferentes extractos de hojas y corteza, se documenta que existen diferencias significativas al comparar la cantidad de metabolito, y según los resultados obtenidos, fue el extracto etanólico de hojas, con un rango entre 4.879-5.079 mg/g, quien presentó una mayor cantidad del metabolito secundario de escopoletina.

Para la especie vegetal *Coffea arabica* L., son atribuidas propiedades farmacológicas, como actividades antioxidantes y antiinflamatoria, gracias a la presencia de compuestos como la cafeína y trigonelina. Además, importantes efectos estimulantes en el cerebro, así como en los sistemas cardiovascular, respiratorio, renal, gastrointestinal, y en el tejido adiposo. Por estos motivos se cuantificó los metabolitos cafeína y trigonelina presentes en *C. arabica*. Según los datos obtenidos, para la cuantificación de cafeína, los rangos encontrados oscilan entre 0.612-0.660%, y son comparables con el límite mínimo permitido por el Reglamento Técnico Salvadoreño, el cual es 0.4%, sobre base seca. Para la cuantificación de trigonelina, los valores se encuentran entre los rangos de 0.601-0.712%, lo que indica que se encuentran dentro de los valores conocidos tradicionalmente para la especie Arabica, que van de 0.6-1.3%.

Se busca también que las técnicas analíticas especificadas y desarrolladas en esta investigación puedan ser aplicadas a futuros estudios en especies vegetales que contengan los metabolitos secundarios de interés, teniendo en cuenta, concentraciones, posibles interferencias y todos aquellos factores que se deben tomar en cuenta en un desarrollo de método.

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales (LIPN) de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, entre los meses de marzo a noviembre del año 2022.



**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Cuantificar por HPLC-DAD los metabolitos secundarios de cafeína y trigonelina en *Coffea arabica* L y escopoletina en *Persea schiedeana* Ness.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Preparar extractos de hojas y corteza de *Persea schiedeana* Ness e infusiones de granos de “café” tostado de *Coffea arabica* L, en muestras previamente recolectadas y tratadas.
- 2.2.2 Desarrollar y verificar los parámetros de validación de una metodología HPLC-DAD, para la cuantificación de escopoletina, cafeína y trigonelina.
- 2.2.3 Determinar los parámetros de desempeño de la validación en el método analítico para la cuantificación de escopoletina, cafeína y trigonelina, aplicando los lineamientos descritos en la Conferencia Internacional sobre Armonización Q2 (ICH).
- 2.2.4 Analizar e interpretar los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros de desempeño de la validación del método analítico para la cuantificación de escopoletina, cafeína y trigonelina.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEÓRICO**

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades de las plantas

Las plantas son organismos vivos y como tal se comportan. Para poder vivir, desarrollan diferentes rutas metabólicas mediante las cuales obtienen la energía necesaria para poder vivir, desarrollarse y reproducirse. El proceso mediante el cual la planta obtiene la energía necesaria para su vida se conoce con el nombre de fotosíntesis.

La fotosíntesis convierte el dióxido de carbono y el agua en glucosa y oxígeno. La planta se encuentra expuesta a las inclemencias del medio que le rodea, y unida al suelo a través de su sistema radicular por el cual obtiene gran cantidad de nutrientes necesarios para su vida y desarrollo. Por lo que, al analizar las rutas metabólicas que sigue la planta para la producción de metabolitos primarios y secundarios, es de considerar muchos factores externos como por ejemplo luz, agua, temperatura, suelos y factores internos como la genética y hormonas, que afectan al crecimiento de la planta y, por ende, su metabolismo. <sup>(1)</sup>

#### 3.1.2 Naturaleza química de las plantas

Los componentes químicos de las drogas vegetales son generalmente abundantes y de estructura diversa. Según su naturaleza química (Ver Tabla N° 1) se pueden clasificar en: Inorgánicos y Orgánicos, los compuestos orgánicos que se hallan presentes en el vegetal y pueden proceder del metabolismo primario o del metabolismo secundario. <sup>(2)</sup>

Tabla N°1. Clasificación de drogas vegetales según su naturaleza química (2)

Compuestos Inorgánicos	Compuestos Orgánicos	
	Procedentes del metabolismo primario	Procedentes del metabolismo secundario
Agua Minerales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glúcidos (osas simples, oligosacáridos)</li> <li>• Lípidos y ceras vegetales</li> <li>• Aminoácidos y proteínas</li> <li>• Ácidos nucleicos</li> <li>• Compuestos nitrogenados: glucósidos cianogenéticos, glucosinolatos, enzimas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, polisacáridos)</li> <li>saponinas, cardiotónicos</li> <li>• Derivados fenólicos: <u>Shikimatos</u>: fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos</li> <li><u>Acetatos</u>: quinonas, antracénosidos</li> <li>• Alcaloides</li> </ul>

### 3.1.3 Rutas biosintéticas de las plantas.

Existen dos tipos fundamentales de metabolismo:

- Metabolismo primario: Se considera esencial para la vida y es común a todos los seres vivos del mundo.
- Metabolismo secundario: No se considera esencial para la vida y únicamente se produce en ciertos grupos vegetales.

En los vegetales en los que se producen metabolitos secundarios son muy importantes puesto que da lugar a productos que resultan de sumo interés desde el punto de vista farmacológico. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden, de hecho, de metabolitos secundarios. (2)

### 3.2 Metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario, pero de limitada distribución en el reino de las plantas, restringidos a un grupo taxonómico particular. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada. <sup>(3)</sup>

Los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario, pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos. Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo, los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas. Además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos <sup>(4)</sup>

Se agrupan en cuatro clases principales, estos son: Terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides.

#### 3.2.1 Generalidades de alcaloides.

La diversidad estructural y la gama de actividades farmacológicas hacen de los alcaloides uno de los grupos de compuestos más importantes entre las sustancias naturales con interés terapéutico. <sup>(1,5)</sup>

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal, dotados de actividades fisiológicas diversas, así como de presentar toxicidad a determinadas dosis.

### 3.2.1.1 Estructura química.

Los alcaloides son compuestos que contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su estructura, son de bajo peso molecular y se encuentran principalmente en las plantas. El nitrógeno está presente en forma de amina 1°, 2° o 3° el cual generalmente confiere la basicidad, lo que facilita el aislamiento y la purificación. Sin embargo, el grado de alcalinidad es muy variable, dependiendo de la estructura de la molécula del alcaloide y la localización de otros grupos funcionales. En la naturaleza también se encuentran alcaloides conteniendo una amina cuaternaria, de esta función depende su actividad biológica.<sup>(3)</sup>

### 3.2.1.2 Acciones farmacológicas y drogas con alcaloides de interés.

Los alcaloides son sustancias que suelen tener actividad incluso a dosis muy bajas. Muchos de ellos son sustancias muy tóxicas, por lo que se deben extremar las precauciones cuando se utilicen terapéuticamente. Hay muchos tipos de alcaloides y, por ello, sus aplicaciones son muy variadas. De acuerdo con su origen biosintético, los alcaloides muestran una gran diversidad estructural en una homogeneidad bioquímica, es decir, se puede agrupar los alcaloides naturales conocidos por sus precursores biogénéticos. (Ver Figura N°1).<sup>(6)</sup>

Las bases xánticas son alcaloides derivados de la purina. Las más importantes son las metilxantinas como la cafeína, la teobromina y la teofilina. En general, todas las bases xánticas presentan las siguientes actividades farmacológicas: Estimulante nervioso, Acción antidepresiva, acción diurética., actividad digestiva, acción estimulante cardíaca, acción vasoconstrictora, acción broncodilatadora y acción lipolítica. Otras propiedades de las bases xánticas son: actividad vasodilatadora periférica, efecto antiagregante plaquetario y efecto antioxidante.

Son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático y, por lo tanto, son polifenólicas. (7)

### Clasificación de Alcaloides

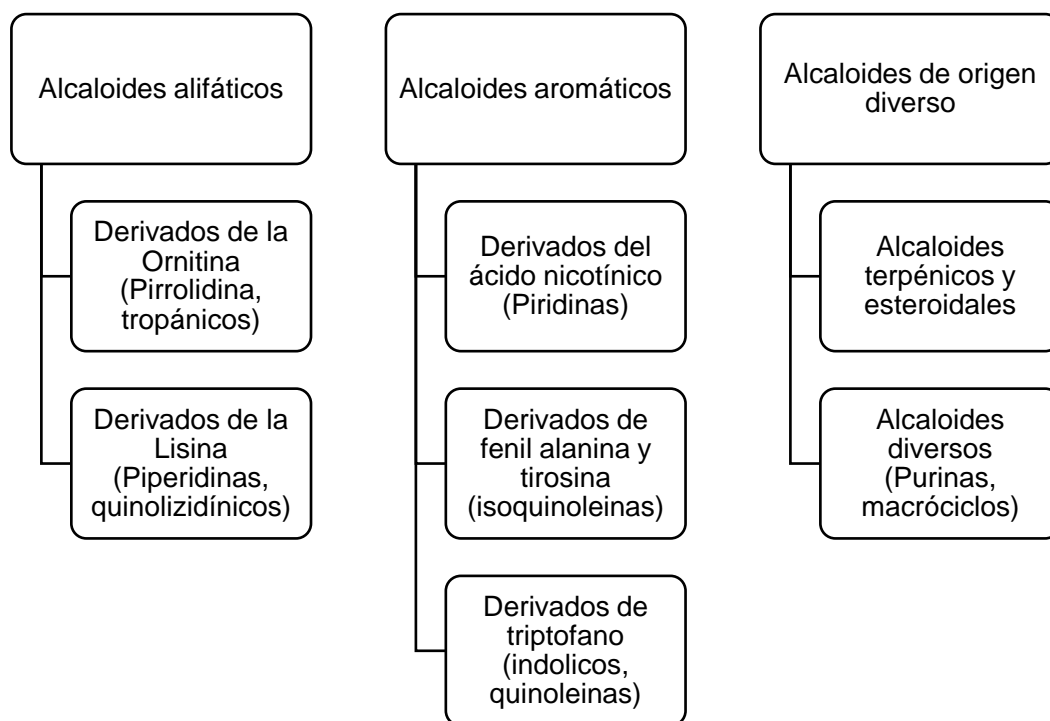


Figura N°1. Clasificación de Alcaloides según su origen. (7)

Se pueden encontrar como aglicones libres o en forma de O-heterósidos o C-heterósidos, unidos generalmente a glucosa, que es el azúcar más frecuente. De los tres anillos, el anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el anillo B y la unidad C; (que forma el anillo C) proceden de la ruta del ácido shikímico.



### 3.2.2 Generalidades de las cumarinas

Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en la familia Umbiliferae y Rutáceae, se encuentran en todas las partes de las plantas, desde la raíz a flores y frutos, siendo más abundante en estos últimos, se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o glicósidos.

(8)

#### 3.2.2.1 Estructura y clasificación

Las cumarinas de las cuales solo el 5% carece de oxígeno en su estructura en la posición -7, pueden clasificarse como se muestra en la Figura N°2.

#### 3.2.2.2 Propiedades farmacológicas

Los compuestos que se engloban bajo la denominación de cumarinas tienen estructuras muy variadas y, debido a ello, se observa una gran variabilidad en sus acciones farmacológicas. Las principales acciones que se han apreciado para las diferentes cumarinas son acción vitamínica p: disminuyen la permeabilidad capilar y refuerzan los capilares, tónicos venosos, foto sensibilizadoras, antiinflamatorios, antiespasmódicos, vasodilatadores coronarios, ligero efecto hipnótico, sedantes, anticoagulantes (dicumarol). (8)

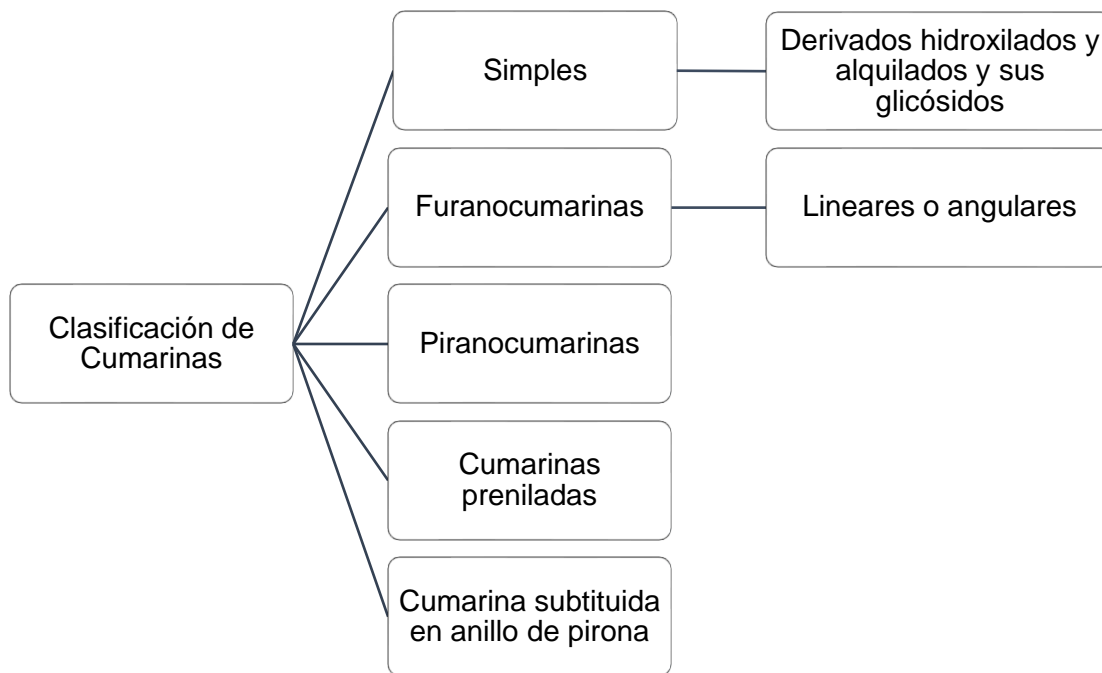


Figura N° 2. Clasificación de Cumarinas según su estructura. (13)

### 3.3 Purificación y aislamiento de metabolitos en plantas

La purificación y el aislamiento de los principios activos se puede llevar a cabo por métodos fisicoquímicos no cromatográficos o por métodos cromatográficos.

Métodos fisicoquímicos no cromatográficos: Incluyen toda una serie de operaciones como la sedimentación, decantación, centrifugación, filtración, precipitación selectiva, cristalización, partición, etc.

Métodos cromatográficos: consisten en la separación de los componentes de una mezcla debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria (un sólido poroso o un líquido retenido en un soporte sólido) cuando

la mezcla es transportada por una fase móvil (eluyente: puede ser líquido o gaseoso).<sup>(9)</sup>

Las técnicas cromatográficas, además de ser métodos para purificar y aislar productos, tienen utilidad cualitativa (Identificación) porque el tiempo de retención cromatográfico es una característica de cada sustancia, y cuantitativa (determinación), porque es posible recoger las diferentes fracciones de un cromatograma y determinar la cantidad de componente. La diferente velocidad de elución de los componentes se debe a uno de los siguientes fenómenos: adsorción, partición, intercambio iónico o exclusión molecular.

Cuando la cromatografía se utiliza para separar mezclas más o menos complejas se determina cromatografía preparativa. Cuando permite recuperar los productos de partida separados para su posterior identificación y cuantificación se denomina cromatografía analítica.<sup>(10)</sup>

Las principales técnicas cromatográficas utilizadas son:

- Cromatografía en capa fina, CCF o TLC
- Cromatografía líquida:
- Cromatografía líquida en columna, CL
- Cromatografía de alta resolución, HPLC-DAD
- Cromatografía de gases, CG

### 3.4 Especies vegetales de estudio

#### 3.4.1 *Coffea arabica* L.

El “Café” es un arbusto que pertenece a la familia de las rubiaceae y del género *Coffea*. Son arbustos que tienen una altura entre los 10-12 metros, pero para

facilitar su manejo, se poda entre los 2 y 4 metros, además son plantas que requieren de climas y suelos tropicales. El fruto del “café” es una cereza que cuando nace es de un color verde y luego cambia a amarillo o hasta tomar un color rojo, lo que significa que ha alcanzado su plena madurez, en el interior de cada cereza, hay dos semillas separadas por un surco y rodeadas de una pulpa amarilla. Estos granos están protegidos por una película plateada llamada mucilago y recubiertos por una piel de color amarillo.<sup>(11)</sup>

#### 3.4.2 Variedades de “café” salvadoreño.

El Salvador es un país con “café” 100% arábica. Cerca del 68% del territorio dedicado a la producción de “café” está sembrado con cafetos de la variedad Bourbon, el 29% con Pacas y el 3% restante con variedades como el Pacamara, el Caturra, Catuai, Catistic y el Pacamara, un híbrido obtenido en El Salvador resultado del cruce de la variedad Pacas y Maragogipe Rojo.<sup>(12)</sup>

#### 3.4.3 Propiedades de la variedad PACAS de “café” salvadoreño.

Se originó de una mutación del Bourbon tradicional, descubierta en 1949 en la finca San Rafael, cantón Palo Campana (Volcán de Santa Ana), departamento Santa Ana, propiedad de la familia Pacas. En esa época la planta llamó la atención de los caficultores por su aspecto morfológico compacto y la llamaron de varias formas: Híbrido de Arábigo con San Ramón, Cafeto del Norte y Cafeto del Viento, posteriormente se le asignó el nombre variedad PACAS, en honor al apellido de la familia en cuya propiedad se identificó la variedad.

En el año 1960, el ISIC inició el estudio del PACAS, con el objetivo de observar las diferencias morfológicas con respecto a los cultivares CATURRA ROJO (Brasil) y VILLA SARCHI (Costa Rica), concluyendo que genéticamente son similares. La variedad PACAS está distribuida en el 27% del total del país.

Sus principales características son: Porte bajo, con ramas laterales que forman un ángulo de 45 grados. Follaje abundante, hojas de color verde oscuro con brillo y ligeramente consistentes y entrenudos cortos que le dan un aspecto compacto. Tolerancia a los problemas de sequía, viento y sol. El fruto es de color rojo, de excelente calidad de bebida. Se adapta mejor a altitudes de 500 a 1,000 msnm y tolera suelos de baja capacidad de retención de agua.<sup>(13)</sup>

#### 3.4.4 Áreas y bosques cafetaleros.

El cultivo de “café” en El Salvador se encuentra distribuido en pequeñas áreas por todo el país (Ver Figura N °3), muchas de las cuales concentradas en la parte nororiental. Sin embargo, la más extensa se encuentra en los alrededores del volcán de San Vicente, desde los 500 metros sobre el nivel del mar hasta más de 1.500 metros. <sup>(14)</sup>

La máxima producción unitaria que se puede encontrar en ciertas partes del área es de 10 a 11 quintales por hectárea, aunque es más común obtener solamente de 8 a 9. En total, actualmente se estima que el cultivo del “café” en el país ocupa una superficie de 152.339 ha, localizadas, por lo general, en zonas de pendiente muy pronunciada y alta susceptibilidad a la erosión, por lo que los bosques cafetaleros se han convertido en una excelente herramienta para preservar el cultivo de “café” en el país. Estos bosques se encuentran en diferentes zonas del territorio salvadoreño, erigiéndose como importantes zonas de desarrollo para las comunidades que viven a su alrededor: <sup>(15)</sup>

1. Sierra Alotepec, Metapán,
2. Sierra Apaneca, Ilamatepec,
3. Cordillera del Bálsamo, Quezaltepec,

4. Volcán Chinchontepec,
5. Cordillera Tecapa, Chinameca
6. Cordillera Cacahuatique.



Figura N°3. Regiones cafetaleras de El Salvador (15)

### 3.4.5 Composición química del “café”.

El “café” tiene compleja composición química, que incluye compuestos volátiles y no volátiles, di terpenos, alcaloides, fenoles, azúcares, aminoácidos, etc., los cuales son importantes para el sabor del café, la calidad y los efectos para la salud. Los compuestos químicos presentes en el café presentar una relación directa con las características organolépticas (Ver Tabla N°2).(7)

Tabla N° 2. Relación organoléptica de los compuestos químicos presentes en el café.

Compuestos	Características organolépticas
Azúcares reductores	Sabor, aroma y color
Ácidos alifáticos	Acidez, aroma y cuerpo
Ácidos clorogénicos	Otorga sabor amargo, cuerpo y astringencia en la bebida
Cafeína	Amargor
Lípidos	Transporte de aromas y sabores
Polisacáridos	Retención de aromas, da cuerpo a la bebida
Proteínas	Contribuyen al amargor y sabor, formación de espuma
Sacarosa	Amargo, color, acidez, aroma y sabor
Trigonelina	Contribuye al amargor y aroma deseable

Fuente: Elaboración propia.

### 3.5 *Persea schiedeana* Ness,

#### 3.5.1 Origen y Generalidades

Llamado comúnmente “coyo”, “coyocte”, “chal te”, “chinini”, “chucte”, “chupte”, “aguacate de monte”, “aguacatón”, “pera salvaje” y “yas”; crece de forma natural en bosques desde el sur de México hasta Panamá, en altitudes entre los 700 y 1900 msnm. *Persea schiedeana* Ness, es un árbol perteneciente a la familia de las lauráceas, El árbol mide usualmente entre los 15 a 20 m de alto, muy ocasionalmente hasta los 50 m. Las ramas jóvenes son densamente caféscastañas, el árbol posee hojas ovaladas, generalmente curvadas en la base de 12.5 a 30 cm de largo y 7 a 15 cm de ancho. Es usualmente blanco en el envés. La fruta, tiene generalmente forma de pera, pesa aproximadamente en promedio de 227 - 397 g con una piel o cáscara gruesa, cueruda y flexible.

Varios autores la describen de color como café blanquecino, café claro, verde pálido, café verdoso o café oscuro. La pulpa es aceitosa con un jugo muy lechoso, con pocos o muchos hilos fibrosos, pero con un muy marcado sabor como a aguacate y coco. La semilla es bien larga. Los cotiledones a diferencia de los del

aguacate son internamente rosados. Las mejores frutas de los árboles nativos son comercializadas en los mercados locales. La madera es usada para la construcción y para carpintería. <sup>(16)</sup>

### 3.5.2 Composición química y propiedades farmacológicas

Varios metabolitos secundarios de este género se han reportado, como alcaloides, terpenoides, flavonoides y cumarinas, que poseen actividades biológicas como antiinflamatoria, antiparasitaria, antifúngica e insecticida, entre otros. Estudios anteriores indican que el género *Persea* muestra actividad analgésica en ensayos in vivo en animales modelos, como los tratamientos terapéuticos convencionales como los AINE.

Tiene usos etnobotánicos para la hipertensión, diarrea, vómitos, dolor de cabeza, sistema nervioso, relajante, enfermedades de la piel, entre otros. <sup>(17)</sup>

### 3.6 Desarrollo de métodos analíticos

La validación de un método analítico es un proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, en las cuales las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

<sup>(18)</sup>.

#### 3.6.1 Tipos de procedimientos analíticos a ser validados

La discusión de la validación dirige a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos:

- Pruebas de identificación.
- Ensayos cuantitativos de contenido de impurezas.



- Ensayos de límite para el control de impurezas.
- Pruebas cuantitativas del resto activo en muestras de sustancia o producto farmacéuticos u otro(s) componente(s) seleccionado(s).

Las pruebas de identificación están destinadas a garantizar la identidad de un analito en una muestra. Este es normalmente logrado por comparación de una propiedad de la muestra (por ejemplo, espectro, comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.) al de un patrón de referencia.

La validación de un método de análisis requiere la realización experimental de los diversos parámetros de desempeño los cuales son: Exactitud, Precisión, Especificidad / Selectividad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Linealidad, Intervalo / Rango, Robustez. <sup>(19)</sup>

### 3.6.2 Parámetros de desempeño

Son características de validación que necesitan ser evaluadas aplicándolas al método, equipo o sistema en estudio. <sup>(20, 21)</sup>

#### 3.6.2.1 Exactitud

Es la proximidad entre resultados de la prueba, obtenidos mediante dicho método y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo, entre más pequeña es dicha diferencia la exactitud es mejor. En el cual se debe de evaluar experimentalmente un mínimo de tres niveles de concentración, cada uno por triplicado realizando así nueve determinaciones en total reportando el resultado como porcentaje de recobro.

### 3.6.2.2 Precisión.

Es la cercanía o grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión se puede expresar matemáticamente con tres variables (Ver Tabla N°5); la desviación estándar  $\sigma$ , estimada analíticamente por S o comúnmente como porcentaje de coeficiente de variación (%CV). En el presente estudio se utilizará como porcentaje de coeficiente de variación (%CV).

Tabla N° 3. Medidas de expresión de Precisión. <sup>(20,21)</sup>

Variables de expresión para la Precisión	
Repetibilidad	Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, entre otros.) en un mismo laboratorio.
Precisión intermedia	Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas
Reproducibilidad	Estudia la variabilidad método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios

### 3.6.2.3 Selectividad /Especificidad.

La selectividad se define como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compararse utilizando otros procedimientos analíticos complementarios. Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC-I) han preferido el término selectividad reservando especificidad para procedimientos que resulten completamente selectivos. Para las pruebas que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes consecuencias:

- Pruebas de identificación: garantiza la identidad del analito.
- Pruebas de Pureza: garantiza que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito.
- Valoraciones: proporcionan un resultado exacto, que permitan una declaración exacta del contenido o potencia del contenido en una muestra.

#### 3.6.2.4 Límite de detección

El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar, aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. El límite de detección es una característica de las pruebas de límite, que simplemente comprueban que la cantidad del analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón, entre otras).

#### 3.6.2.5 Límite de cuantificación

Corresponde a la mínima concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonable en las condiciones de operación, en este caso generalmente se mide la señal de fondo relación señal/ruido, efectuando mediciones repetidas sobre un blanco.

#### 3.6.2.6 Linealidad

La linealidad en un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por

medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras en un intervalo dado. La linealidad es obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta, ya sea lineal o no.

La linealidad puede ser aplicada de dos maneras:

- Linealidad del sistema: Capacidad del sistema de medición para proporcionar una indicación que tenga una relación lineal con una magnitud determinada distinta de una magnitud de influencia.
  
- Linealidad del método: habilidad del método para obtener resultados de la pruebas proporcionales a la concentración del analito.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 Tipo de estudio

#### 4.1.1 Estudio bibliográfico

Una investigación del material bibliográfico, tomando como base estudios anteriores, donde se cuantificó el contenido de metabolitos de especies vegetales de interés en publicaciones científicas, utilizando fuentes diversas de información, bases de datos, como: ResearchGate, The Pharmaceutical Journal, Royal society of chemistry, Google académico, ScienceDirect, Academia.edu, PubMed, European Pharmacopea, previas investigaciones y artículos científicos en internet, al mismo tiempo, se llevó a cabo una búsqueda de la información pertinente en el sistema bibliotecario de la Universidad de El Salvador.

#### 4.1.2 Estudio experimental de laboratorio

El desarrollo y validación de metodologías por HPLC-DAD de cuantificación de metabolitos secundarios de interés en especies vegetales seleccionadas de *Persea schiedeana* Ness (escopoletina) y la adaptación de una metodología para *Coffea arabica* L. (cafeína y trigonelina), se llevó a cabo en el laboratorio de investigación en productos naturales (LIPN) de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

#### 4.1.3 Estudio prospectivo

Las metodologías y resultados obtenidos en esta investigación serán utilizados en estudios adicionales, tanto por el LIPN y/o en otras investigaciones

independientes al LIPN, que desee cuantificar los metabolitos secundarios de cafeína, trigonelina y escopoletina.

#### 4.1.4 Estudio retrospectivo

Debido a que se tomó como base muestras que con anterioridad habían sido recolectadas, se llevó a cabo la recolección de hojas y corteza de *P. schiedeana* el día 21 de Julio de 2021 y la recolección de los granos de *C. arabica* el 20 de febrero de 2022.

## 4.2 Investigación de campo

### 4.2.1 Universo

Las especies vegetales *Coffea arabica* L y *Persea schiedeana* Ness, en las que están presentes los metabolitos secundarios de interés investigativo, farmacéutico o cosmético.

### 4.2.2 Muestra

Para la investigación, se tomó en cuenta la disponibilidad, el acceso al lugar, el estado de la especie vegetal y la delimitación de las zonas seleccionadas. Dos especies vegetales de la flora salvadoreña, fuentes de metabolitos secundarios de interés (Ver Tabla N°4) fueron seleccionadas.

Tabla N° 4. Especies vegetales de flora salvadoreña seleccionadas recolectadas.

Espece Vegetal	Órgano estudiando	Familia	Sitio de Recolección	Fecha de Recolección
<i>Coffea arabica</i> L	Frutos rojos maduros	Rubiaceae / Bourbon	Finca "El Zapote", La Palma, Chalatenango.	20 febrero de 2022
<i>Persea schiedeana</i> Ness	Hojas & Corteza	Lauraceae	cantón "El Jocotón", Coatepeque, Santa Ana	21 de Julio de 2021

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2.3 Métodos e instrumentos.

##### 4.2.3.1 Selección y recolección de especies vegetales.

Se recolectaron las especies vegetales descritas en Tabla N°1. Las hojas y corteza de la especie vegetal, *Persea schiedeana* y los frutos maduros de color rojo para *Coffea arabica*. Ambas especies en su estado óptimo, es decir que no estuvieran afectadas por enfermedades, parásitos o materiales extraños, y así lograr una mejor obtención de metabolitos secundarios de cafeína, trigonelina y escopoletina. Las especies vegetales recolectadas fueron identificadas por Jenny Menjívar, curadora del herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador, quien asignó un número correlativo para las especies vegetales, con el propósito de establecer la trazabilidad si se desea continuar con el estudio. Por lo que, se registró los siguientes datos: nombre común, nombre científico, fecha de recolecta, lugar de recolecta y persona que recolectó, coordenadas, características, altitud, etc.

##### 4.2.3.2 Recolección, identificación y preparación del material vegetal *Persea schiedeana* Ness.



Siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.2.4.1, se constató que la muestra proporcionada corresponde a *P. schiedeana* Ness y se asignó una constancia de identificación y un número de voucher (Ver Tabla N° 5), la cual sirve para mantener una correcta trazabilidad del estudio.

Tabla N°5. Datos de Recolección de *Persea schiedeana* Nees “Shucte”.

Familia	Lauraceae
Fecha	21-Julio-2021
Lugar	Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana.
Coordenadas	Latitud 13.917726, 13°55'3.81"N Longitud -89.519575, 89°31'10.47"W
No. de Voucher	J Menjívar et al Marvin J Núñez 4205

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2.3.3 Recolección, identificación y preparación del material vegetal *Coffea arabica* L.

Siguiendo el proceso descrito en el apartado anterior, se realizó la selección de los granos maduros de color rojo de “café”, fue importante evitar la recolección de material que estuviera afectado por enfermedades, parásitos o materiales extraños que puedan interferir en las determinaciones de metabolitos secundarios de cafeína y trigonelina.

Se constató, que la muestra proporcionada corresponde a *C. arabica* L y se asignó un número de voucher (Ver Tabla N°6), la cual nos sirve para mantener una correcta trazabilidad del estudio.

Tabla N°6. Datos de Recolección de *C. arabica* L.

Familia	Rubiaceae
Fecha	20-febrero-2022
Lugar	Finca “El Zapote”, La Palma, Chalatenango.
Coordenadas	Latitud: 14° 18' 33" N: Longitud 89° 15 8' 45" O: 11340 msnm.
No. de Voucher	J. Menjívar y K. Contreras 5206.

Fuente: Elaboración propia.

### 4.3 Parte experimental

Los materiales, reactivos y equipos utilizados en esta investigación, están descritos en Anexo N°1.

#### 4.3.1 Cuantificación de escopoletina en extractos secos de *P. schiedeana* Ness.

Se presenta un esquema de trabajo, en Anexo N°2, en el cual se muestra resumido las operaciones más importantes realizadas con la especie vegetal durante el desarrollo del trabajo de investigación.

##### 4.3.1.1 Preparación de extractos hexánico y etanólico de hojas y corteza de *Persea schiedeana* Ness.

- Lavar cuidadosamente las hojas y corteza de especie *P. schiedeana* Ness con agua destilada.
- Fraccionar las hojas y corteza en pequeñas partes.
- Secar las hojas y corteza en horno a 40°C durante 56 horas.
- Cumplido el tiempo de secado, retirar las hojas y corteza del horno y moler hasta la obtención de un polvo fino menor a 2 mm.
- Pesar por separado, 200 g. de hojas y 200 g. de corteza de *P. schiedeana* Ness.
- Adicionar 5,000 mL de hexano a las hojas de *P. schiedeana* Ness.
- Adicionar 5,000 mL de hexano a la corteza de *P. schiedeana* Ness.
- Macerar los extractos obtenidos durante 10 días.
- Filtrar y concentrar las muestras bajo presión reducida en un rotaevaporador (Yamato serie RE301) a 40°C.

- Los extractos secos son pesados y almacenados en desecador hasta su análisis.

NOTA: Se realizó el mismo procedimiento, tanto para hojas y corteza, por separado y para preparar el extracto etanólico, solamente se cambió de solvente.

#### 4.3.1.2 Preparación de extracto acuoso de hojas y corteza de *Persea schiedeana* Ness.

- Lavar cuidadosamente las hojas y cortezas de especie *P. schiedeana* Ness con agua destilada.
- Fraccionar las hojas y cortezas en pequeñas partes.
- Secar las hojas en horno a 40°C durante 56 horas.
- Cumplido el tiempo de secado, retirar las hojas y cortezas del horno y moler hasta la obtención de un polvo fino menor a 2 mm.
- Pesar 20 g. de hojas y 20 g. de corteza de *P. schiedeana* Ness y extraer cada uno con 400 mL de agua preservada con propilparabeno (0.02%), metilparabeno (0.18%) y bisulfito de sodio (0.5%).
- Realizar a ambos extractos una decocción por 10 min, para la correcta disolución de los preservantes.
- Macerar los extractos obtenidos durante 10 días.
- Filtrar los extractos obtenidos y concentrar las muestras, utilizando un evaporador (Genevac™, Serie EZ-2). Para eliminar el solvente y obtener el extracto seco.

#### 4.3.1.3 Preparación de muestra para HPLC-DAD.

- Empleando el solvente orgánico metanol. Preparar una solución a partir de los extractos etanólicos, hexánicos y acuosos de hojas y corteza de *P. schiedeana* Ness a una concentración de 1 mg/mL.
- Agitar las muestras hasta alcanzar la disolución completa. De ser necesario utilizar un baño ultrasonido para lograr su disolución y mantener la temperatura inferior a 25°C.
- Retirar el vial del ultrasonicador y filtrar las soluciones a través de un filtro de 0.45 µm.
- Recibir en un vial de HPLC de 1mL y rotular.

NOTA: Este procedimiento se realizó por triplicado en cada extracto dando como resultado 24 muestras.

#### 4.3.1.4 Preparación de soluciones estándar de escopoletina.

- Pesar 10 mg de escopoletina en balanza de precisión (Ohaus Explorer®, Precision Balance, modelo OBX-223), con capacidad de 220 g y legibilidad de 0.001 g.
- Adicionar 9 mL de metanol y disolver con ayuda de un baño ultrasonido.
- Transferir a un balón volumétrico de 10 mL.
- Realizar lavados con metanol al beaker y transferir al balón.
- Aforar el balón empleando el mismo disolvente.
- Almacenar y rotular como solución stock de escopoletina (1000 ppm).
- A partir de las soluciones estándar de 1000 ppm de escopoletina y con ayuda de una micropipeta, tomar volúmenes adecuados para preparar 5 niveles de concentraciones (100; 75; 50; 6.25; 1.0 ppm) (Ver anexo N°3)
- Filtrar cada nivel de estándar por un filtro de nylon de 0.45 µm.

- Recibir la solución filtrada en un vial para HPLC de 1 mL.
- Rotular cada nivel de concentración.

Nota: Se prepararon diferentes soluciones stock, para cada curva realizada.

#### 4.3.1.5 Preparación de fase móvil para cuantificación de escopoletina por método HPLC-DAD

- Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de solución A: agua: ácido acético y solución B: metanol
- Para Solución A: Medir 10 mL de ácido acético HPLC, y agregarlos a una probeta de 1000 mL, conteniendo agua ultrapura.
- Utilizar un kit de filtración por succión al vacío, el cual consta de un embudo de vidrio, filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y un frasco de recepción de vidrio.
- Filtrar la solución, pasándolo por el frasco de recepción de vidrio y aplicar vacío al frasco.
- Sonicar la solución filtrada por 15 min y rotular. (Ver Anexo N°4)
- Para Solución B: Medir 1000 mL de metanol HPLC en una probeta.
- Filtrar la solución, pasándolo por el frasco de recepción de vidrio y aplicar vacío al frasco, luego sonicar la solución filtrada por 15 min y rotular.

#### 4.3.1.6 Método analítico desarrollado para cuantificación de escopoletina.

El mismo procedimiento fue aplicado para las lecturas de los estándares, blanco (metanol) y muestras.

- Encender HPLC-DAD modelo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Alemania).
- Programar el equipo de HPLC-DAD a la longitud de 366 nm. Utilizar una columna analítica Hypersil GOLD (C18, 150mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )

- Ajustar el volumen de inyección de 20  $\mu$ L.
- Realizar un método de gradiente. Utilizando la fase móvil A: agua: ácido acético (1:10) y B: metanol.
- Ambientar el equipo al menos 30 min con la fase móvil a emplear
- Realizar la corrida a un flujo de fase móvil 1ml/min.
- El gradiente a utilizar se realizó con un tiempo de corrida del minuto 0 a 6, con la fase móvil A: 70% y B:30%, manteniendo el flujo hasta el minuto 6, al minuto 6-10 se aplicó una corrida con gradiente desde B: 30% hasta 90%. Del minuto 10-11 se mantuvo constante con B: 90%. Del minuto de 11-11.30 se aplicó otra gradiente llevando la fase móvil del 90% al 30%. Del minuto de 11.30-12.30 se mantuvo constante a una fase móvil de A:70% y B:30%.
- Programar la secuencia de inyección de cada estándar, blanco y solución de muestra, por triplicado en el automuestreador.

#### 4.3.2 Cuantificación de cafeína y trigonelina en café tostado de *C. arabica* L.

Se presenta un esquema de trabajo, en Anexo N°5, en el cual se muestra resumido las operaciones más importantes realizadas con la especie vegetal durante el desarrollo del trabajo de investigación.

##### 4.3.2.1 Preparación de infusiones de especie vegetal

- Moler el grano “Café” tostado con molino de marca Mahlkönig, modelo K32510. Usando un tamaño medio-grueso y preparar 3 extractos de *C. arabica* de la siguiente manera:
- Pesar la cantidad de 8.250 g de “Café” molido, en un pocillo de porcelana de capacidad de 150 mL, en balanza analítica (marca Shimadzu, modelo TW423L) realizar 3 pesadas individuales para cada muestra.

- Adicionar 150 mL de agua ultrapura a T° de 94.4°C en cada pocillo de porcelana que contiene la muestra.
- Filtrar el extracto, a través de un filtro de 0.45 µm.
- Una vez filtrada la muestra, realizar 3 lavados al pocillo con 5 mL de agua ultrapura y rotular.

#### 4.3.3 Preparación de muestras y soluciones estándar de *C. arabica* L.

##### 4.3.3.1 Preparación de muestra para HPLC-DAD

- Empleando la fase móvil orgánica (metanol) preparar una solución a 1 mg/mL, a partir de la infusión realizada de *Coffea arabica* L.
- Agitar las muestras hasta alcanzar la disolución completa.
- De ser necesario utilizar un baño ultrasonido para lograr su disolución y mantener la temperatura inferior a 25°C.
- Retirar el vial del ultrasonicador y rotular.
- Filtrar las soluciones a través de un filtro de 0.45 µm.
- Recibir en un vial de 1mL de HPLC y rotular.
- Realizar el procedimiento por triplicado, a partir de esta muestra, determinar cafeína y trigonelina simultáneamente. Dando un total de 3 muestras.

##### 4.3.3.2 Preparación de la solución stock de cafeína.

- Pesar 10 mg de cafeína en balanza de precisión (Ohaus Explorer ®, Precision Balance, modelo OBX-223).
- Adicionar 9 mL de la fase móvil (metanol) y disolver con ayuda de un baño ultrasonido. Tomando en cuenta, que se debe mantener la temperatura inferior a 25°C.

- Transferir a un balón volumétrico de 10 mL.
- Realizar lavados con metanol y se transferir al balón.
- Llevar a aforó empleando el mismo disolvente.
- Almacenar y rotular como solución stock de cafeína (1000 ppm).

Nota: Se prepararon diversas soluciones stock, para cada curva realizada.

#### 4.3.3.3 Preparación de la solución stock de trigonelina.

- Pesar por triplicado, 10 mg de trigonelina en balanza de precisión (Ohaus Explorer®, Precision Balance, modelo OBX-223).
- Adicionar 9 mL de la fase móvil (metanol) y disolver con ayuda de un baño ultrasonido. Tomando en cuenta mantener la temperatura inferior a 25°C.
- Transferir a un balón volumétrico de 10 mL.
- Realizar lavados con metanol y se transferir al balón.
- Llevar a aforó empleando el mismo disolvente.
- Almacenar y rotular como solución stock de trigonelina (1000 ppm).

Nota: Se prepararon diversas soluciones stock, para cada curva realizada.

#### 4.3.3.4 Preparación de soluciones combinadas de cafeína y trigonelina.

- A partir de las soluciones estándar de 1,000 ppm de cafeína y trigonelina (Ver Anexo N°6) y con ayuda de una micropipeta medir volúmenes adecuados para preparar 5 niveles de concentraciones tanto para cafeína (5-100 ppm) como para trigonelina (50-400 ppm) en la misma solución.
- Filtrar las soluciones través de un filtro de membrana de 0.45 µm.
- Disponer la solución filtrada en un vial para HPLC-DAD de 1 mL.
- Rotular cada nivel de concentración.



#### 4.3.3.5 Preparación de fases móviles para cuantificación de cafeína y trigonelina por método HPLC-DAD

- Se realizó el mismo procedimiento que en el apartado 4.3.2.5 utilizando los solventes descritos en el método analítico propuesto para cuantificación de cafeína y trigonelina.

#### 4.3.3.6 Método analítico propuesto para cuantificación de cafeína y trigonelina.

El mismo procedimiento fue aplicado para las lecturas de los estándares, blanco y muestras.

- Encender el HPLC-DAD modelo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Alemania).
- Programar el equipo de HPLC-DAD a la longitud de onda de 266 nm. Realizar un procedimiento isocrático. Utilizando la fase móvil A: Agua ultrapura; ácido acético (1:10) y B: Metanol.
- Utilizar una columna analítica Hypersil GOLD (150mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m)
- Ambientar el equipo al menos 30 min con la fase móvil.
- Ajustar el volumen de inyección de 10  $\mu$ L.
- Programar la secuencia de inyección de cada estándar, blanco y solución de muestra, por triplicado en el automuestreador.

#### 4.3.4 Verificación de parámetros de validación en métodos analíticos para cuantificación de metabolitos secundarios.

##### 4.3.4.1 Selectividad

- Realizar de acuerdo con el método de análisis establecido por la ICH Q2 (R1).
- Determinar el parámetro, comparando los resultados de análisis e identificar una señal representativa del metabolito.
- No debe mostrar interferencias con posibles artefactos de la línea de base, solventes, residuos u otras impurezas relacionadas.

##### 4.3.4.2 Linealidad

- Preparar por triplicado, las soluciones stock del metabolito secundario con una concentración de 1000 ppm
- A partir de las soluciones stock, preparar tres curvas de calibración con 5 niveles de concentración correspondiente al rango (5-100 ppm) (Ver anexo N°7).
- Realizar de acuerdo con el método de análisis Q2(R1), una determinación de cada solución de estándar para cada una de las 3 series.
- Calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), ordenada de origen ( $b_0$ ), coeficiente de determinación ( $r^2$ ) e intervalo de confianza para la pendiente IC( $b_1$ ).

##### 4.3.4.3 Repetibilidad, precisión intermedia y exactitud.

- Preparar por triplicado, tres niveles de concentración que cubran el rango especificado en la metodología analítica a desarrollar (por ejemplo; 1, 50 y 100 ppm para escopoletina).

- Realizar de acuerdo con el método de análisis las determinaciones y manteniendo las condiciones del día, analista, materiales y equipo.
- Realizar la determinación del método con el cálculo del porcentaje de coeficiente de variación (CV) de las respuestas que se obtengan y el cálculo de la desviación estándar (SD).
- Para la exactitud determinar el porcentaje de recobro de la cantidad conocida del analito agregado a la matriz y comparará el valor real obtenido con el valor teórico esperado, tomando en cuenta el nivel de porcentaje utilizado.

#### 4.3.4.4 Límite de detección y cuantificación

- Calcular la desviación estándar basada en la respuesta que se obtenga de la preparación de una serie de blancos, analizados según las condiciones específicas del método analítico.
- Determinar el límite cuantificación y límite de detección mediante las fórmulas matemáticas reflejadas (Ver Anexo N°7)

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados y discusión de resultados obtenidos de los parámetros de desempeño de métodos analíticos para la cuantificación de metabolitos secundarios en las especies vegetales de *Coffea arabica* L y *Persea schiedeana* Ness.

### 5.1 Selección y recolección de especies vegetales de *Persea schiedeana* Ness.

#### 5.1.1 Recolección, identificación y preparación del material vegetal *Persea schiedeana* Ness.

Las muestras recolectadas e identificadas fueron utilizadas para llevar a cabo, la preparación de los extractos, tal y como se describe en los numerales 4.3.2.1 y 4.3.2.2. Aplicando la ecuación N°1, se determinaron los porcentajes de rendimiento, de cada uno de los extractos realizados (Ver Figura N°4 y Tabla N°7).

Se presentan los datos de los porcentajes de rendimiento (p/p) para cada extracto vegetal realizado (Ver Tabla N°7), se puede apreciar que el porcentaje de rendimiento de extracción más alto se obtuvo con el extracto etanólico de hojas con 15.40%, por el contrario, la muestra con menor porcentaje fue del extracto hexánico de corteza con 1.15%. Con respecto a los rendimientos de los extractos vegetales realizados, fue comparado con los resultados obtenidos de extractos

realizados en el LIPN, donde su promedio oscilaba entre los rangos 5.8–18.1%, 2.7–11.5%, 10.4–48.8%, y 6.3% para partes aéreas, hojas y cortezas.(22)

Lavar hojas de *P. schiedeana*  
con agua destilada y fraccionar



Secar las hojas a 40 °C por 56 horas,  
y moler hasta obtener un polvo fino, menor a 2 mm.



Adicionar agua preservada.



Transferir a un balón  
de 1,000 mL.



Pesar las hojas  
secas y molidas.



Evaporar muestra



Pesar y almacenar  
el extracto hasta análisis

Figura N°4. Preparación de extractos acuoso de hojas de *P. schiedeana*  
Ness.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N°7. Datos obtenidos de los rendimientos de extractos de *P. schiedeana* realizados.

Extracto etanólico de hojas de <i>Persea schiedeana</i> Ness		
Peso extracto seco	Pesaje muestra	% p/p
30.7766 g	200 g	15.40%
Extracto etanólico de corteza de <i>Persea schiedeana</i> Ness		
Peso mx. vegetal	Pesaje inicial ext.	Rendimiento
36.8737 g	1000 g	3.69%
Extracto hexánico de hojas de <i>Persea schiedeana</i> Ness		
Peso mx. vegetal	Pesaje inicial ext.	Rendimiento
5.9904 g	250 g	2.39%
Extracto hexánico de corteza de <i>Persea schiedeana</i> Ness		
Peso mx. vegetal	Pesaje inicial ext.	Rendimiento
2.8892 g	250 g	1.15%
Extracto acuoso de hojas de <i>Persea schiedeana</i> Ness		
Peso mx. vegetal	Pesaje inicial ext.	Rendimiento
2.4790 g	50 g	4.96%
Extracto acuoso de corteza de <i>Persea schiedeana</i> Ness		
Peso mx. vegetal	Pesaje inicial ext.	Rendimiento
0.5326 g	40 g	1.33%

Fuente: Elaboración propia.

- Ejemplo de cálculo para porcentaje de rendimiento, de extracto etanólico de hojas de *P. schiedeana*.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Extracto seco}}{\text{Peso de mx}} \times 100 \quad (\text{Ecu N}^{\circ}1)$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{30.7766 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100 = 15.40\%$$

Se presentan los datos de los porcentajes de rendimiento (p/p) para cada extracto vegetal realizado (Ver Tabla N°7), se puede apreciar que el porcentaje de rendimiento de extracción más alto se obtuvo con el extracto etanólico de hojas con 15.40%, por el contrario, la muestra con menor porcentaje fue del extracto hexánico de corteza con 1.15%.

Con respecto a los rendimientos de los extractos vegetales realizados, fue comparado con los resultados obtenidos de extractos realizados en el LIPN, donde su promedio oscilaba entre los rangos 5.8–18.1%, 2.7–11.5%, 10.4–48.8%, y 6.3% para partes aéreas, hojas y cortezas. <sup>(22)</sup>

## 5.2 Descripción del método analítico a desarrollar para cuantificación de escopoletina en *Persea schiedeana* Ness.

### 5.2.1 Desarrollo de la metodología HPLC-DAD

Se logró establecer en este estudio las mejores condiciones para el trabajo en HPLC-DAD, realizando previos estudios bibliográficos, y probando diferentes situaciones, se desarrolló el método. El método seleccionado fue cromatografía en fase reversa (RP). Y de acuerdo con la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas del metabolito (como su estructura química, solubilidad, etc.) se escogió el uso de una columna C<sub>18</sub>, 150mm x 4.6 mm, 5 µm, por la superficie que posee, mejora la selectividad al momento de separar sustancias polares, el cual es el caso del metabolito de interés en el estudio, además posee la ventaja de tener una gran capacidad de retención, alta selectividad y un largo tiempo de retención. <sup>(23,24)</sup>

Para el desarrollo del método, se utilizó un detector con arreglo de diodos (DAD), lo cual permitió realizar un análisis a múltiples longitudes de ondas, es así como



se realizó un barrido entre 200 a 800 nm para poder obtener los espectros de absorción de escopoletina, y seleccionar las longitudes de ondas a utilizar.

Se tomaron como referencia métodos que están descritos en la bibliografía, con respecto a la cuantificación de compuestos fenólicos <sup>(25,26)</sup>, con el objetivo de obtener una fase móvil que nos proporcionara una retención adecuada para el metabolito en estudio. Inicialmente, se probaron diferentes solventes, para solución A, fue únicamente agua y para la solución B, acetonitrilo, y una fase móvil isocrática, es decir, las condiciones de las fases móviles se mantenían constantes y la proporción utilizada era de A:60% y B:40%, al analizar bajo estas condiciones, el metabolito no eluía correctamente, y la resolución cromatográfica mostraba picos superpuestos, además los tiempos de retención que se mostraban no eran reproducibles. Para mejorar la resolución cromatográfica, finalmente se propone entonces una fase móvil polar constituida por una mezcla de agua con ácido acético al 1% y como solvente orgánico, metanol. El método se realizó por gradiente de elución, en donde la composición de la fase móvil se fue cambiando, por lo que se tuvo que determinar la composición inicial y final del solvente y ajustar los tiempos de elución.

También se realizaron diferentes pruebas para la determinación de volumen de inyección, temperaturas y posibles interferencias.

Realizado todo este proceso, se muestra en la Tabla N°8, las mejores condiciones que se encontraron experimentalmente.

Tabla N°8. Condiciones cromatográficas de análisis por HPLC-DAD.

Columna	Hypersil GOLD (C18, 150mm x 4.6 mm, 5 µm)	
Fase móvil	A: Agua: ácido acético (1;10) B: Metanol	
Método de Gradiente	Minuto	FM
	0-6	A: 70% y B:30%,
	6-10	B: 30% hasta 90%.
	10-11	B: 90%
	11-11.30	B: 90% al 30%.
	11.30-12.30	A:70% y B:30%.
Flujo	1 mL/min	
Blanco	Metanol	
Longitud de onda	366 nm	
Volumen de inyección	20 µL	
Temperatura	25°C	
Tiempo de corrida	12.30 min	

Fuente: Elaboración propia.

### 5.3 Verificación de parámetros de validación para metodología analítica de cuantificación de escopoletina en *P. schiedeana* Ness.

Se incluyen los datos obtenidos en dicho análisis: gráficas, conclusiones, observaciones y aptitud del método. El análisis se llevó a cabo haciendo uso del procedimiento por cromatografía líquida de alta eficiencia. (Ver Tabla N°8)

Para comprobar la efectividad del método cromatográfico, se establecen parámetros de validación a evaluar, con el procedimiento, cálculos y especificaciones requeridos en cada uno de los parámetros.

Los parámetros para evaluar son: Linealidad, selectividad, precisión intermedia, repetibilidad, exactitud, límite de cuantificación y detección.

### 5.3.1.1 Linealidad

En la evaluación del parámetro linealidad, se evaluó la proporcionalidad que existe entre la cantidad de metabolito versus la respuesta obtenida. Para esta determinación se prepararon tres curvas de calibración independientes y cada una con cinco niveles de concentración de los estándares (entre rango de 0.1-100 ppm), este proceso se realizó por triplicado.

Una vez preparadas las soluciones, se filtran e inyectan en el HPLC-DAD, y se procede con la cuantificación de escopoletina. Se obtuvieron en total 45 datos de áreas cada uno con sus respectivos cromatogramas, en la Tabla N°11, se expresan los promedios de las tres repeticiones realizadas de cada una de las soluciones inyectadas. Y son estos datos los que se utilizan para cálculos y determinaciones específicas como: valor de la pendiente ( $b_1$ ), ordenada de origen ( $b_0$ ), coeficiente de determinación ( $r^2$ ), ecuación de la recta ( $y=mx+b$ ) e intervalo de confianza para la pendiente  $IC(b_1)$ . (Ver Anexo N°7)

Con las respuestas obtenidas, y el cálculo de las concentraciones finales reales, se realiza la regresión lineal, esto con la ayuda de herramienta de hojas de cálculo del programa Microsoft Excel ®. Se presentan los datos estadísticos de la evaluación del parámetro de validación en la siguiente tabla:

Tabla N°9. Datos de regresión lineal de parámetro de linealidad.

Estadísticas de la regresión	
Coficiente de correlación múltiple	0.99996
Coficiente de determinación ( $r^2$ )	0.99992
$r^2$ ajustado	0.99990
Error típico	0.43235

Fuente: Elaboración propia.

El valor obtenido para el coeficiente de determinación fue de 0.99996. Los resultados obtenidos indican que el método desarrollado es capaz de explicar la respuesta (áreas) a partir del uso de la variable concentración. Y el estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 99.9924% de la variabilidad. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 0.1 a 100 ppm, se satisfacen las condiciones de linealidad del método analítico, ya que, indica una relación relativamente fuerte entre las variables, por lo que se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal ( $r$ ) mayor que 0,98 y de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ): mayor de 0,95 (Ver Tabla N°9).

Tabla N°10. Análisis de Varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7376.489	7376.489	39462.736	2.8E <sup>-07</sup>
Residuos	3	0.561	0.187		
Total	4	7377.050			

Fuente: Elaboración propia.

Puesto que el valor crítico de F (Ver Tabla N°10) es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración, con un nivel de confianza de 95.0%.

Se obtiene la gráfica que indica el comportamiento de los datos de área vs. concentración de los 5 niveles de la curva de calibración realizada y simultáneamente, se estimó el intercepto y la pendiente de acuerdo con estos datos la ecuación ajustada es  $Y = 0.8724x + 0.0919$ . (Ver Figura N°5).

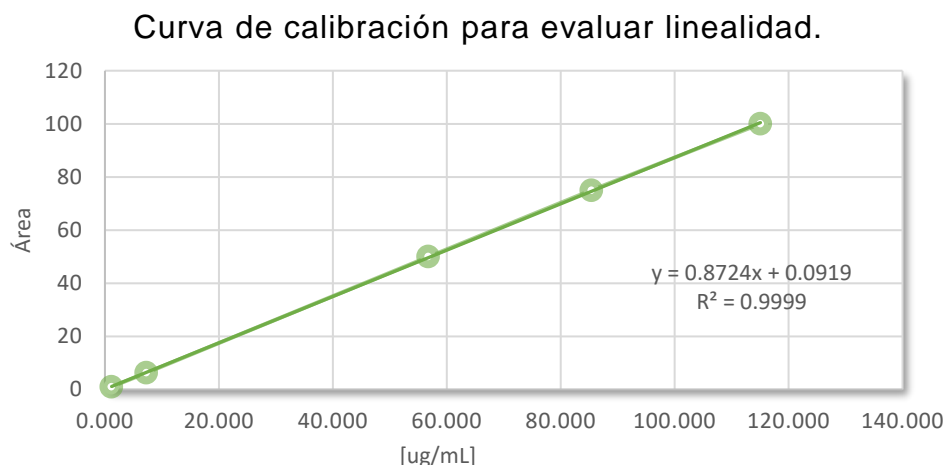


Figura N°5. Curva de calibración para evaluación del parámetro de desempeño de linealidad.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N°11. Resultados de la evaluación para linealidad de método.

Nivel	[ µg/mL]	Área 1	Área 2	Área 3	CV
1	100	115.091	115.080	115.009	0.04
2	75	85.973	85.973	84.2947	1.13
3	50	57.010	57.425	55.925	1.36
4	6.25	7.260	7.088	7.496	1.45
5	1	1.141	1.176	1.183	1.90

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a los criterios de aceptación para métodos cromatográficos se estipula que el CV obtenido a partir de los resultados deberá ser menor o igual a 2.0%.<sup>(27,28)</sup> En la tabla N°11, se expresan los valores promedios de las lecturas de las áreas realizadas. Y utilizando las ecuaciones N°2 y N°3, se realizan los cálculos para obtener los siguientes datos:

Desviación estándar

$$DS = \frac{\sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2}}{n - 1} \quad (\text{Ecu N}^\circ 2)$$

Coeficiente de variación  $CV = \frac{DS}{Y} \times 100$  (Ecu N°3)

Se observó que los coeficientes de variación (CV) en cada nivel de concentración son menores a 2%, lo cual es importante tomar en consideración, ya que cumple con los criterios de aceptación estipulados por la guía de validación (ICH) <sup>(27)</sup> confirmando que, las soluciones fueron adecuadamente preparadas e indica también el correcto funcionamiento del equipo.

#### 5.3.1.2 Selectividad

En cuanto a la selectividad del método de las pruebas realizadas, se evaluaron las posibles interferencias con el metabolito a cuantificar, cambiando las condiciones como fases móviles y tiempos de retención, y no se mostraron picos de interferencia a un tiempo de retención cercano a 5.2 min y a una longitud de onda de 366 nm (Ver anexo N°8). De igual manera se corroboró que no hubiera picos superpuestos considerables con la adición de un material de referencia. (Ver Tabla N°12)

#### 5.3.1.3 Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia.

La exactitud del método se verifica mediante el análisis de un material de referencia certificado. (Ver Anexo N°9). La exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación en un método analítico como la diferencia entre el valor medio obtenido en la valoración y el valor aceptado como real. Para determinar el parámetro de exactitud se empleó el método de adición y recuperación <sup>(27,28)</sup>.

Para la determinación de la precisión del método, la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se trabajan tres niveles diferentes de concentración (altos, medios y bajos) con tres muestras. (Ver Tabla N°12). Si la exactitud se evalúa por el método de adición estándar, se pueden obtener de una vez estos datos para el análisis de la precisión.

De acuerdo con lo antes señalado, para los estudios de exactitud y precisión se analizó por triplicado, las muestras de extracto etanólico de hojas de *P. schiedeana* Ness, por el método desarrollado y se determinó el contenido promedio del analito. Una vez conocido el contenido promedio de escopoletina en la muestra real, se procedió a enriquecer la muestra, por triplicado, con el analito de interés (escopoletina) a diversas concentraciones empleando para ello soluciones estándar de concentraciones iguales a 1, 50 y 100 ppm. Para preparar las soluciones en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra y se agregan cantidades variables de la solución estándar.

Estas soluciones se leyeron a 366 nm en el HPLC-DAD y el procedimiento se repitió tres veces en el mismo día y por el mismo analista, es decir, en condiciones de repetibilidad. De igual forma se repitió el procedimiento en tres días diferentes con el mismo analista, a fin de utilizar los datos obtenidos para la determinación de la precisión intermedia. El % de recuperación del método se calculó a partir del promedio de las recuperaciones individuales con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} \quad \%R = \frac{C_{real}}{C_{adicionada}} \times 100 \quad (\text{Ecu N}^{\circ}4)$$

%R= Porcentaje de recuperación.

C<sub>real</sub>= Concentración real encontrada experimentalmente.

C<sub>adicionada</sub>= Concentración adicionada.

Según los criterios de aceptación especificados en la ICH, para porcentajes de recobro tomando en cuenta que es un método analítico cromatográfico, es del 98.0% al 102.0% de la cantidad añadida. En la Tabla N°12 se muestran los resultados del análisis de la exactitud y los porcentajes de recobro obtenidos, que indican que el método propuesto muestra la exactitud necesaria para considerarlo adecuado para las determinaciones de escopoletina.

Para los estudios de la precisión, que son repetibilidad y precisión intermedia, se realizó el cálculo la desviación estándar relativa para evaluar la precisión del método y el coeficiente de variación (Ver Ecuación N°2 y N°3).

Tabla N°12. Resultados del parámetro de desempeño de exactitud.

Nº de replica	Con. Conocida a adicionar de escopoletina	Áreas encontradas	Can. real encontrada [µg /mL]	Can. adicionada encontrada [µg/mL]	% R	Promedio
1	1	0.582	1.438	1.475	97.48	98.7%
2		0.591	1.445	1.462	98.86	
3		0.601	1.453	1.454	100.00	
1	50	54.264	49.111	49.972	98.27	98.5 %
2		54.757	49.559	49.969	99.17	
3		54.189	49.043	49.963	98.16	
1	100	110.016	99.707	100.038	99.67	99.8 %
2		110.801	100.420	100.038	100.38	
3		109.819	99.529	100.036	99.49	

Fuente: Elaboración propia.

El valor del coeficiente de variación según las especificaciones aceptables de la ICH debe ser menor o igual al 2%.



Además, siguiendo los criterios de la ICH, se determinó también la precisión tomando en consideración, las lecturas de áreas, para lo cual se seleccionaron soluciones con concentraciones de 1, 50 y 100 ppm y se leyeron a 366 nm en el HPLC-DAD en condiciones de repetibilidad.

Para el estudio de la repetibilidad, tal como se señaló anteriormente, el análisis se realizó utilizando los resultados obtenidos para el estudio de la exactitud, y como se puede observar en la Tabla N°13. Se obtuvieron coeficientes de variación que se encuentran por debajo del 2%.

Tabla N°13. Resultados de Repetibilidad.

Repetibilidad						
[µg / mL]	Área	Promedio	$X_i - \bar{X}$	$(x_i - \bar{x})^2$	DS	CV
1	0.582	0.5913	-0.013	0.0002	0.0095	1.607
	0.591		-0.004	0.0000		
	0.601		0.010	0.0001		
Total	1.774		0.008	0.0005		
50	54.264	54.403	-0.1393	0.0194	0.3086	0.5672
	54.757		0.3536	0.1251		
	54.189		-0.2143	0.0459		
Total	54.264					
100	110.016	110.212	-0.196	0.0384	0.5195	0.4714
	110.801		0.589	0.3469		
	109.819		-0.393	0.1544		
Total	330.636					

Fuente: Elaboración propia.

Para la determinación de la precisión intermedia se prepararon igualmente estas soluciones con estas mismas concentraciones en distintos días y se leyeron por triplicado, por el mismo analista.

Los resultados obtenidos para la precisión intermedia se muestran en la Tabla N°14. Se reflejó que el coeficiente de variación calculado fue inferior al valor de 2% aceptable según la ICH. Los resultados obtenidos para la repetibilidad en los análisis realizados y para la precisión intermedia demuestran que el método cumple con las especificaciones y puede ser aplicado con seguridad y eficiencia.

Tabla N°14. Resultados de precisión intermedia.

Precisión Intermedia						
[ug / mL]	Área	Promedio	$X_i - \bar{X}$	$(x_i - \bar{x})^2$	DS	CV
1	1.044	1.047	0.449	0.2016	0.0108	1.0331
	1.038		0.443	0.1962		
	1.059		0.464	0.2153		
Total	3.141					
50	54.642	54.510	0.131	0.0173	0.3732	0.6847
	54.089		-0.421	0.1774		
	54.800		0.290	0.0839		
Total	163.531					
100	110.390	111.156	0.178	0.0316	1.3818	1.2431
	110.326		0.114	0.0131		
	112.751		2.539	6.4455		
Total	333.467					

Fuente: Elaboración propia.

#### 5.3.1.4 Límite de detección y cuantificación

Para conocer la cantidad mínima y máxima en la que se puede cuantificar el método de análisis, se determinó el límite de detección y límite de cuantificación se prepararon diez muestras blanco, con metanol y se realizaron las respectivas lecturas de áreas aplicando el método desarrollado. Estas determinaciones se hicieron a lo largo de la realización de la investigación, y con las fórmulas expresadas se obtuvieron los resultados siguientes (Ver Anexo N°7) (Ver Tabla N°15):

Tabla N°15. Resultados de los parámetros para límite de detección y cuantificación.

N.º	Área Blanco	Promedio	DS	LD	LC
1	0.0021	0.0196 µg /mL	0.0137 µg /mL	0.0609 µg /mL	0.1023 µg /mL
2	0.0107				
3	0.0252				
4	0.0157				
5	0.0269				
6	0.0114				
7	0.018				
8	0.0375				
9	0.0443				
10	0.0046				
Total	0.1964				

Fuente: Elaboración propia.

#### 5.4 Cuantificación del metabolito secundario de escopoletina en *Persea schiedeana* Ness.

Se analizaron las muestras de extractos de hojas y cortezas de *P. schiedeana*, se observó que los picos correspondientes al metabolito de interés se encontraron libres de interferencias, por lo que demuestra que el método fue eficiente para separar los compuestos. En la tabla N°16, se muestran los valores obtenidos de escopoletina (Ver Anexo N°10).

Si bien es cierto, en el caso de *P. schiedeana* Ness, es la primera vez que se estudia la cuantificación de metabolitos secundarios, se han registrado previamente estudios cualitativos en especies pertenecientes a la familia Lauraceae, en hojas de *Persea americana* Milli, se estudia la composición química, que es caracterizada por diferentes grupos de metabolitos y entre estos, se encontraron cumarinas, y fue, escopoletina el representante aislado (29,30).

Tabla N°16. Datos obtenidos de las muestras de *P. schiedeana* Ness.

Extracto acuoso				
Parte Vegetal	Área	$\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	mg de escopoletina / g extracto	mg de escopoletina/100 g de hoja seca
Hojas	0.039	$0.3300 \pm 0.0036$	$0.3301 \pm 0.0036$	$1.6366 \pm 0.0036$
	0.041	$0.3318 \pm 0.0036$	$0.3318 \pm 0.0036$	$1.6452 \pm 0.0036$
	0.033	$0.3248 \pm 0.0036$	$0.3249 \pm 0.0036$	$1.6108 \pm 0.0036$
Corteza	0.007	$0.3023 \pm 0.0018$	$0.3023 \pm 0.0018$	$0.4025 \pm 0.0018$
	0.011	$0.3057 \pm 0.0018$	$0.3058 \pm 0.0018$	$0.4071 \pm 0.0018$
	0.008	$0.3031 \pm 0.0018$	$0.3032 \pm 0.0018$	$0.4037 \pm 0.0018$
Extracto etanólico				
Parte Vegetal	Área	$\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	mg de escopoletina / g extracto	mg de escopoletina/100 g de hoja seca
Hojas	0.024	$0.3170 \pm 0.0075$	$0.3171 \pm 0.0075$	$4.8792 \pm 0.0075$
	0.039	$0.3300 \pm 0.0075$	$0.3301 \pm 0.0075$	$5.0796 \pm 0.0075$
	0.024	$0.3170 \pm 0.0075$	$0.3171 \pm 0.0075$	$4.8792 \pm 0.0075$
Corteza	0.003	$0.2988 \pm 0.0009$	$0.2988 \pm 0.0075$	$1.1617 \pm 0.0075$
	0.004	$0.2997 \pm 0.0009$	$0.2997 \pm 0.0075$	$1.1651 \pm 0.0075$
	0.002	$0.2979 \pm 0.0009$	$0.2980 \pm 0.0075$	$1.1583 \pm 0.0075$
Extracto hexánico				
Parte Vegetal	Área	$\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	mg de escopoletina / g extracto	mg de escopoletina/100 g de hoja seca
Hojas	0.052	$0.3500 \pm 0.0048$	$0.35006 \pm 0.0048$	$0.83880 \pm 0.0048$
	0.047	$0.3457 \pm 0.0048$	$0.34572 \pm 0.0048$	$0.82840 \pm 0.0048$
	0.041	$0.3405 \pm 0.0048$	$0.34051 \pm 0.0048$	$0.81592 \pm 0.0048$
Corteza	0.155	$0.4394 \pm 0.0036$	$0.43949 \pm 0.0048$	$0.50791 \pm 0.0048$
	0.149	$0.4342 \pm 0.0036$	$0.43428 \pm 0.0048$	$0.50188 \pm 0.0048$
	0.147	$0.4325 \pm 0.0036$	$0.43254 \pm 0.0048$	$0.49988 \pm 0.0048$

Fuente: Elaboración propia.

Por igual en estudios realizados en extractos etanólicos de *Persea caerulea*, en la se reportó, utilizando el método de Cromatografía de Masas, por primera vez

cumarinas, y entre ellas fue la escopoletina uno de las estructuras identificadas más importantes <sup>(31)</sup>, tomando como base estas investigaciones, fueron de gran importancia, ya que dieron lugar a realizar la búsqueda de metabolitos secundarios pertenecientes a la familia de la especie vegetal de interés para la investigación.

En general, el contenido de escopoletina detectado, tanto en hojas como en corteza de *P. schiedeana*, fue más alto que el reportado en literatura, que fue con la especie de *Argyreia speciosa*, en la que se ha llevado a cabo la cuantificación de escopoletina mediante HPLC-DAD, en los cuales los niveles reportados del estudio fueron de 0.0246 a 0.0016 mg/ g de base seca <sup>(32)</sup>. Estas discrepancias observadas posiblemente se ven reflejadas por las diferencias entre las familias y géneros de las especies vegetales, las técnicas cromatográficas utilizadas y el tratamiento previo de la muestra para la cuantificación. A pesar de estas diferencias, se toma en cuenta el estudio del método desarrollado, debido a que sirve como base, para tener una estimación de cuantificación de escopoletina en una especie vegetal. En la Tabla N°16, se reflejan los resultados para *P. schiedeana*, en donde se encuentra la cantidad de miligramos de escopoletina que hay en relación con cada uno de los diferentes extractos realizados. Cuando se comparan los datos obtenidos de las cuantificaciones de cada extracto, se demuestra que existen diferencias significativas atribuidas al empleo de los distintos solventes, y se observa que existe mayor cantidad de escopoletina, cuando el solvente empleado es etanol, con un rango de 4.8792-5.0796 mg / 100 g de hojas seca y de 1.1583-1.1651 mg / 100 g de corteza seca, pero es de interés observar que fue posible detectar por igual, cantidades importantes de escopoletina, tanto para los extractos acuosos y hexánicos de hojas y corteza de *P. schiedeana* Ness.

Los resultados en la cuantificación del metabolito secundario, da la importancia etnobotánica a la especie vegetal de *P. schiedeana*, gracias a que escopoletina ha sido descrita como un compuesto con diverso rango de propiedades farmacológicas <sup>(33,34)</sup>. Por ello la especie vegetal puede utilizarse en el desarrollo de nuevos Fito medicamentos, que pueden ser una fuente importante de fármacos más seguros para el tratamiento del dolor e inflamación, ya que gracias a sus propiedades farmacológicas poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y antiespasmódica, entre muchas otras. O utilizarse para el desarrollo de fitocosméticos, por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas ideales para el tratamiento de eccemas, dermatitis y acné <sup>(35)</sup>.

#### 5.5 Selección y recolección de especie vegetal de *Coffea arabica* L.

Las muestras recolectadas e identificadas fueron utilizadas para llevar a cabo, la preparación de las infusiones, tal y como se describe en el numeral 4.3.3.1.

A la muestra recolectada de los granos de “Café”, se les aplicó el proceso de tueste, que se divide en diferentes etapas, se empezó por un tratamiento de despulpado realizado por los trabajadores de la Finca “El Zapote” y luego fue secado, durante esta etapa el contenido de agua del “Café” se evaporó, una vez secos los granos de “Café”, se sometieron al tostado y se obtuvo un grano oscuro y brillante (Ver Figura N°6), de aroma intenso y sabor dulce característico de la variedad Bourbon.<sup>(11)</sup>



Figura N°6. “Café” tostado de variedad Bourbon.

Fuente: Elaboración propia.

Como siguiente paso se procedió a la molienda de la muestra de “Café” tostado (Ver Figura N°7), siguiendo las especificaciones establecidas por la *Specialty Coffee Association (SCA)* <sup>(36)</sup>, para obtener un tamaño medio-grueso de los granos de “Café”.



Figura N°7. Molienda de “Café” tostado.

Fuente: Elaboración propia.

## 5.6 Preparación de infusiones de *Coffea arabica* L.

Una vez terminado el proceso de molienda, se pudo llevar a cabo la elaboración de las infusiones por método de vertido, con los granos de “Café” molido. En la Figura N°8, Se refleja el proceso realizado tal cual se describió en el apartado 4.3.3.1.



Figura N°8. Preparación y filtración de extractos de *C. arabica* L.

Fuente: Elaboración propia.

## 5.7 Descripción del método analítico para cuantificación de cafeína y trigonelina en *Coffea arabica* L.

En el caso del método para cuantificación de cafeína y trigonelina, se hizo la adecuabilidad de un método establecido y reportado previamente en la literatura (37). Existen otros estudios en los que se ha realizado la cuantificación simultánea de estos dos metabolitos, pero para adaptarlos a las condiciones del laboratorio y de la investigación, se han realizado cambios, inicialmente, el método se trabajó con una elución isocrática de A:60% y B:40%, pero los cromatogramas revelaban que la muestra no era capaz de eluir correctamente.



Se refleja en la Tabla N° 17, las mejores condiciones cromatográficas por las cuales se realizó el estudio para la cuantificación de cafeína y trigonelina:

Tabla N°17. Condiciones cromatográficas de análisis por HPLC-DAD.

Columna	Hypersil GOLD (C18, 150mm x 4.6 mm, 5 µm)
Fase móvil	A: Agua ultrapura; ácido acético B: Metanol
Método Isocrático	A: 95% B:5%
Flujo	1 mL/min
Blanco	Metanol
Longitud de onda	200-400 nm
Volumen de inyección	10 µL
Temperatura	25°C
Tiempo de corrida	14 min

Fuente: Elaboración propia.

#### 5.8 Verificación de parámetros de validación en metodología analítica para cuantificar cafeína y trigonelina en *C. arabica* L.

El método utilizado para determinar cafeína y trigonelina fue validado para verificar que su realización y rendimiento cumpliera con los requerimientos de rutina, y se evaluaron los parámetros de desempeño como: selectividad, linealidad, precisión intermedia, repetibilidad, exactitud, límite de cuantificación y detección. El método fue validado de acuerdo con los lineamientos dictados por la Conferencia Internacional sobre Armonización Q2 (ICH) <sup>(27)</sup>

Nota: La cuantificación y la verificación de los parámetros de validación se llevaron a cabo en una sola corrida para ambos metabolitos. Pero los resultados obtenidos se reflejan por separado para una comprensión y representación más ordenada.

### 5.8.1 Validación de metodología analítica para cuantificar cafeína en *C. arabica* L.

#### 5.8.1.1 Linealidad

Con las respuestas obtenidas, y el cálculo de las concentraciones finales reales, se realiza la regresión lineal, esto con la ayuda de herramienta de hojas de cálculo del programa Microsoft Excel ®. Se presentan los datos estadísticos de la evaluación del parámetro de linealidad

La linealidad fue evaluada construyendo una curva de calibración con un estándar de cafeína en el rango de 1-100 ppm. Al realizar la regresión lineal se indica la relación entre los valores obtenidos con la recta de ajuste y los obtenidos experimentalmente. En la Tabla N °18 se indica el estadístico  $r^2$  ajustado que explica 99.9327% de la variabilidad. El coeficiente de correlación es igual a 0.9997, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.9254. Con los valores obtenidos podemos confirmar que se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal ( $r$ ) mayor que 0.98 y de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ): mayor de 0.95, establecidos por la ICH.<sup>(27)</sup>

Tabla N°18. Datos de regresión lineal de parámetro de linealidad.

Estadísticas de la regresión	
Coficiente de correlación múltiple	0.9997
Coficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9993
$r^2$ ajustado	0.9991
Error típico	0.9254

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla N°19, podemos observar que el valor crítico de F, es menor que 0.05, por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla N°19. Análisis de Varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	3813.720	3813.720	4453.394	0.000007
Residuos	3	2.569	0.856		
Total	4	3816.290			

Fuente: Elaboración propia.

Se obtiene la gráfica que indica el comportamiento de los datos de área vs. concentración de los 5 niveles de la curva de calibración realizada y simultáneamente, se estimó el intercepto y la pendiente, de acuerdo con estos datos la ecuación ajustada es  $Y = 0.7336x + 0.1956$ . (Ver Figura N°9).

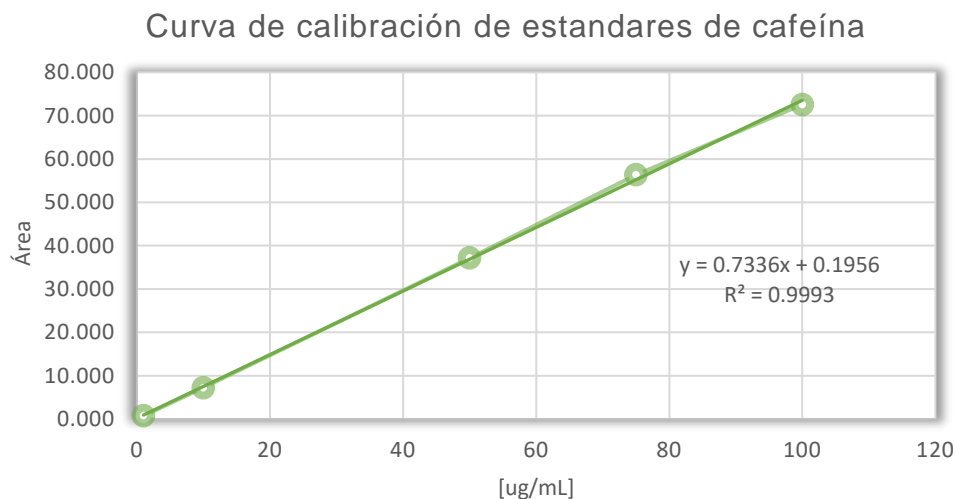


Figura N°9. Curva de calibración de la linealidad de cafeína.

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a los criterios de aceptación para métodos cromatográficos se estipula que el CV obtenido a partir de los resultados deberá ser menor o igual a 2.0%.<sup>(38)</sup> En la Tabla N°20, se expresan los valores promedios de las lecturas de las áreas realizadas para cafeína. Se realizan los cálculos para obtener los siguientes datos. (Ver Ecuación N°2 y N°3).

Tabla N°20. Resultados de la evaluación para linealidad de método de cafeína.

Nivel	[ µg/mL]	Área 1	Área 2	Área 3	CV
1	1	0.770	0.756	0.7592	0.786
2	10	7.071	7.316	7.3031	1.557
3	50	37.130	36.829	37.5237	0.765
4	75	56.340	57.384	55.446	1.404
5	100	72.421	73.631	71.6306	1.134

Fuente: Elaboración propia.

Se observó que los coeficientes de variación (CV) en cada nivel de concentración son menores a 2%<sup>(32)</sup>, lo cual es importante tomar en consideración, ya que cumple con los criterios de aceptación estipulados por la guía (ICH) confirmando que, las soluciones fueron adecuadamente preparadas e indica también el correcto funcionamiento del equipo.

#### 5.8.1.2 Selectividad

En cuanto a la selectividad del método de las pruebas realizadas, se evaluaron las posibles interferencias con el metabolito a cuantificar (Ver anexo N°11), cambiando las condiciones como fases móviles y tiempos de retención, y no se mostraron picos de interferencia a un tiempo de retención de 11.3 min a 266 nm. De igual manera se corroboró que no hubiera picos superpuestos considerables con la adición de un material de referencia. (Ver Tabla N°21)

### 5.8.1.3 Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia

La exactitud del método se verifica mediante el análisis de un material de referencia certificado de cafeína. (Ver Anexo N°12). La exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación en un método analítico como la diferencia entre el valor medio obtenido en la valoración y el valor aceptado como real. Como se explica en el apartado 5.4.1.3 la determinación de los parámetros de exactitud y precisión se realizó siguiendo los mismos lineamientos, tomando en cuenta, concentraciones diferentes y condiciones cromatográficas.

En la Tabla N°21 se muestran los resultados del análisis de la exactitud y los porcentajes de recobro obtenidos para cafeína, que indican que el método propuesto muestra la exactitud necesaria para considerarlo adecuado en las determinaciones. Esto según los criterios de aceptación especificados, para porcentajes de recobro tomando en cuenta que es un método analítico cromatográfico, es del 98.0% al 102.0% de la cantidad añadida. (28)

Tabla N°21. Resultados de exactitud para cafeína.

Nº de replica	Con. Conocida a adicionar de escopoletina	Áreas encontradas	Can. real encontrada [µg /mL]	Can. adicionada encontrada [µg/mL]	% R
1	100	98.291	126.9870	124.5261	101.98
2		98.259			
3		97.711			
1	50	48.627	63.3055	63.7959	99.23
2		48.956			
3		49.287			
1	1	0.9843	1.1409	1.1500	99.21
2		0.9911			
3		1.0147			

Fuente: Elaboración propia.

Para los estudios de la precisión, que son repetibilidad y precisión intermedia, se realizó el cálculo tal y como se describe en el apartado 5.4.3. Para el estudio de la repetibilidad, tal como se señaló anteriormente, el análisis se realizó utilizando

los resultados obtenidos para el estudio de la exactitud, y como se puede observar en la Tabla N°22. se obtuvieron coeficientes de variación que se encuentran por debajo del 2%.

Tabla N°22. Resultados de repetibilidad para cafeína.

Repetibilidad						
[µg / mL]	Área	Promedio	$\bar{X}_i - \bar{X}$	$(x_i - \bar{x})^2$	DS	CV
100	98.29	98.09	98.29	9661.12	0.33	0.33
	98.26		98.26	9654.83		
	97.71		97.71	9547.44		
Total	294.26		0.01	28863.39		
50	48.63	48.96	-0.33	0.11	0.33	0.67
	48.96		0.00	0.00		
	49.29		0.33	0.11		
Total	146.87		0.00	0.22		
1	0.98	0.99	0.92	0.85	0.02	1.54
	0.99		0.93	0.86		
	1.01		0.95	0.90		
Total	2.98		2.80	2.61		

Fuente: Elaboración propia.

Para la determinación de la precisión intermedia se prepararon igualmente estas soluciones con estas mismas concentraciones en distintos días y se leyeron por triplicado, por el mismo analista. Los resultados obtenidos para la precisión intermedia se muestran en la Tabla N°23.

Se reflejó que el coeficiente de variación calculado fue inferior al valor de 2% aceptable según la ICH <sup>(32,33)</sup>. Los resultados obtenidos para la repetibilidad en los análisis realizados y para la precisión intermedia demuestran que el método cumple con las especificaciones y puede ser aplicado con seguridad y eficiencia.

Tabla N°23. Resultados de precisión intermedia para cafeína.

Precisión Intermedia						
[µg / mL]	Área	Promedio	$\bar{X}_i - \bar{X}$	$(x_i - \bar{x})^2$	DS	CV
1	0.861	0.869	0.861	0.741	0.014	1.595
	0.861		0.861	0.741		
	0.885		0.885	0.783		
Total	2.607		0.008	2.266		
50	37.015	36.956	0.059	0.003	0.102	0.275
	37.015		0.059	0.003		
	36.839		-0.117	0.014		
Total	110.869		0.000	0.021		
100	73.915	73.820	73.855	5454.522	0.164	0.222
	73.915		73.855	5454.522		
	73.631		73.571	5412.653		
Total	221.461		221.280	16321.696		

Fuente: Elaboración propia.

#### 5.8.1.4 Límite de detección y cuantificación

Para conocer la cantidad mínima y máxima en la que se puede cuantificar el método de análisis, se determinó el límite de detección y límite de cuantificación preparándose como se describió en el apartado 5.4.1.4.

Estas determinaciones se hicieron a lo largo de la realización de la investigación, en la Tabla N°24 se presentan los resultados obtenidos para el parámetro determinado.

Tabla N°24. Resultados de los parámetros para límite de detección y cuantificación de cafeína.

Nº	Área Blanco	Promedio	DS	LD	LC
1	0.001	0.0258 µg /mL	0.0236 µg /mL	0.0969 µg /mL	0.1680 µg /mL
2	0.011				
3	0.006				
4	0.018				
5	0.027				
6	0.025				
7	0.027				
8	0.080				
9	0.051				
10	0.012				
Total	0.258				

Fuente: Elaboración propia.

### 5.8.2 Validación de metodología analítica para cuantificar trigonelina en *C. arabica* L.

#### 5.8.2.1 Linealidad

Con las respuestas obtenidas, tal y como se realizó en el apartado 5.10.1.1. Se presentan los datos estadísticos de la evaluación del parámetro de linealidad.

La linealidad fue evaluada construyendo una curva de calibración con un estándar de trigonelina en el rango de 5-400 ppm. Al realizar la regresión lineal se indica la relación entre los valores obtenidos con la recta de ajuste y los obtenidos experimentalmente.

En la Tabla N °25 se indica el estadístico  $r^2$  ajustado que explica 99.876% de la variabilidad. El coeficiente de correlación es igual a 0.9995, indicando una



relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 2.1245. Con los valores obtenidos podemos confirmar que se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal ( $r$ ) mayor que 0.98 y de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ): mayor de 0.95, establecidos por la ICH. (32,33)

Tabla N°25. Datos de regresión lineal de parámetro de linealidad.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0.99953
Coeficiente de determinación ( $r^2$ )	0.99907
$r^2$ ajustado	0.99876
Error típico	2.12455

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla N°26, podemos observar que el valor crítico de F, es menor que 0.05, por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla N°26. Análisis de Varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	14539.62	14539.62	3221.22	1.2E <sup>-05</sup>
Residuos	3	13.54	4.51		
Total	4	14553.17			

Fuente: Elaboración propia.

Se obtiene la gráfica que indica el comportamiento de los datos de área vs. concentración de los 5 niveles de la curva de calibración realizada y simultáneamente, se estimó el intercepto y la pendiente (Ver Tabla N°27) de acuerdo con estos datos la ecuación ajustada es  $Y = 0.3738x + 1.2158$  (Ver Figura N°10).

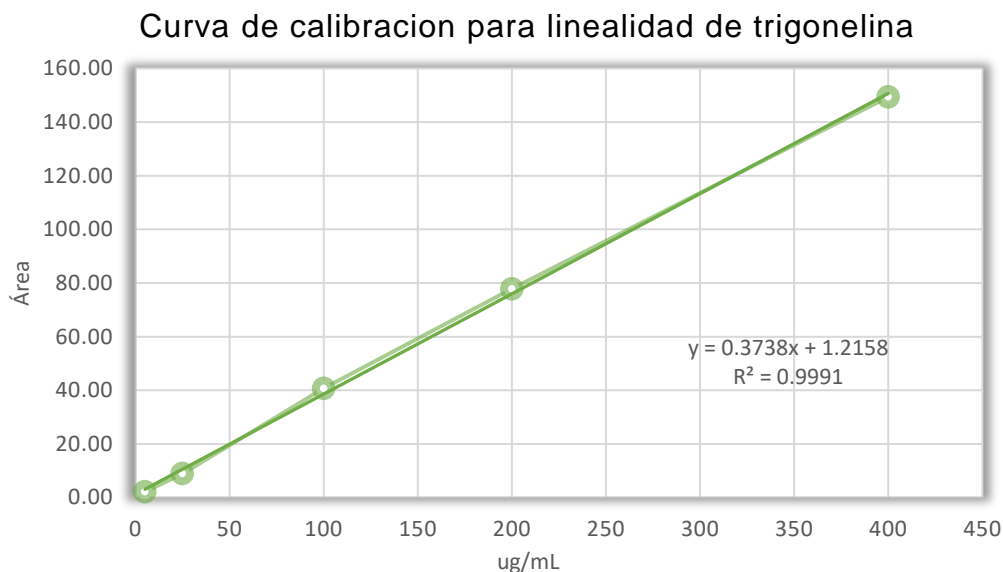


Figura N°10. Curva de calibración para linealidad de trigonelina.

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a los criterios de aceptación para métodos cromatográficos se estipula que el CV obtenido a partir de los resultados deberá ser menor o igual a 2.0%.<sup>(32-33)</sup> En la Tabla N°27, se expresan los valores promedios de las lecturas de las áreas realizadas para trigonelina.

Tabla N°27. Resultados de la evaluación para linealidad de método.

Nivel	[ µg/mL]	Área 1	Área 2	Área 3	CV
1	5	2.144	2.104	2.093	1.037
2	25	8.881	8.884	8.8967	0.077
3	100	40.931	40.9660	40.2804	0.774
4	200	79.277	75.8380	78.3677	1.870
5	400	148.955	151.2600	147.9326	0.932

Fuente: Elaboración propia.

Se observó que los coeficientes de variación (CV) en cada nivel de concentración son menores a 2%<sup>(11,12)</sup>, lo cual es importante tomar en consideración, ya que cumple con los criterios de aceptación estipulados por la guía (ICH) confirmando

que, las soluciones fueron adecuadamente preparadas e indica también el correcto funcionamiento del equipo.

#### 5.8.2.2 Selectividad

En cuanto a la selectividad del método de las pruebas realizadas, se evaluaron las posibles interferencias con el metabolito a cuantificar, cambiando las condiciones como fases móviles y tiempos de retención, y no se mostraron picos de interferencia a un tiempo de retención de 3.2 min a 266 nm. De igual manera se corroboró que no hubiera picos superpuestos considerables con la adición de un material de referencia. (Ver Tabla N°28)

#### 5.8.2.3 Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia.

La exactitud del método se verifica mediante el análisis de un material de referencia certificado de trigonelina. (Ver Anexo N°13). Como se explica en el apartado 5.4.1.3 la determinación de los parámetros de exactitud y precisión se realizó siguiendo los mismos lineamientos, tomando en cuenta, concentraciones diferentes y condiciones cromatográficas.

En la Tabla N°28 se muestran los resultados del análisis de la exactitud y los porcentajes de recobro obtenidos para trigonelina, que indican que el método propuesto muestra la exactitud necesaria para considerarlo adecuado en las determinaciones. Los resultados son aceptados guiándonos de los criterios de aceptación especificados, para porcentajes de recobro tomando en cuenta que es un método analítico cromatográfico, es del 98.0% al 102.0% de la cantidad añadida. <sup>(32,33)</sup>

Tabla N°28. Resultados de exactitud para trigonelina.

N° de replica	Con. Conocida a adicionar de escopoletina	Áreas encontradas	Can. real encontrada [µg /mL]	Can. adicionada encontrada [µg/mL]	% R
1	400	162.005	425.928	429.0	99.07
2		161.098			
3		161.820			
1	100	43.924	112.593	112.0	100.55
2		42.479			
3		43.292			
1	5	1.700	2.631	2.66	98.78
2		1.682			
3		1.650			

Fuente: Elaboración propia.

Para los estudios de la precisión, que son repetibilidad y precisión intermedia, se realizó el cálculo tal y como se describe en el apartado 5.4.3. Para el estudio de la repetibilidad, el análisis se realizó utilizando los resultados obtenidos para el estudio de la exactitud, y como se puede observar en la Tabla N°29. se obtuvieron coeficientes de variación que se encuentran por debajo del 2%.

Tabla N°29. Resultados de repetibilidad para trigonelina.

Repetibilidad						
[µg / mL]	Área	Promedio	$\xi - \bar{X}$	$(\xi - \bar{x})^2$	DS	CV
5	1.70	1.68	1.70	2.89	0.03	1.51
	1.68		1.68	2.83		
	1.65		1.65	2.72		
Total	5.03		0.01	8.45		
100	43.92	43.23	0.69	0.48	0.72	1.67
	42.48		-0.75	0.57		
	43.29		0.06	0.00		
Total	129.70		0.00	1.05		
400	162.01	161.64	161.94	26226.10	0.48	0.30
	161.10		161.04	25933.41		
	161.82		161.76	26166.37		
Total	484.92		484.74	78325.88		

Fuente: Elaboración propia.

Para la determinación de la precisión intermedia se prepararon igualmente las soluciones con estas mismas concentraciones en distintos días y se leyeron por triplicado, por el mismo analista. Los resultados obtenidos para la precisión intermedia se muestran en la Tabla N°30.

Se reflejó que el coeficiente de variación calculado fue inferior al valor de 2% aceptable según la ICH. <sup>(32,33)</sup> Los resultados obtenidos para la repetibilidad en los análisis realizados y para la precisión intermedia demuestran que el método cumple con las especificaciones y puede ser aplicado con seguridad y eficiencia.

Tabla N°30. Resultados de precisión intermedia para trigonelina.

[µg / mL]	Área	Promedio	$X_i - \bar{X}$	$(x_i - \bar{x})^2$	DS	CV
5	2.144	2.114	2.144	4.597	0.027	1.270
	2.104		2.104	4.427		
	2.093		2.093	4.381		
Total	6.341		0.008	13.404		
100	40.966	40.726	0.240	0.058	0.386	0.947
	40.281		-0.445	0.198		
	40.931		0.205	0.042		
Total	122.178		0.000	0.298		
400	151.260	149.383	151.200	22861.359	1.704	1.141
	147.933		147.872	21866.227		
	148.955		148.895	22169.642		
Total	448.148		447.967	66897.228		

Fuente: Elaboración propia.

#### 5.8.2.4 Límite de detección y cuantificación.

Para conocer la cantidad mínima y máxima en la que se puede cuantificar el método de análisis, se determinó el límite de detección y límite de cuantificación para trigonelina preparándose como se describió en el apartado 5.4.1.4.

Estas determinaciones se hicieron a lo largo de la realización de la investigación, en la Tabla N°31 se presentan los resultados obtenidos para el parámetro determinado.

Tabla N°31. Resultados de los parámetros para límite de detección y cuantificación de trigonelina.

Nº	Área Blanco	Promedio	DS	LD	LC
1	0.0561	0.12488 µg /mL	0.07226 µg /mL	0.3417 µg /mL	0.1249 µg /mL
2	0.1894				
3	0.1475				
4	0.1467				
5	0.0130				
6	0.0640				
7	0.0468				
8	0.1960				
9	0.1947				
10	0.1946				
Total	1.2488				

Fuente: Elaboración propia.

#### 5.9 Cuantificación de los metabolitos secundarios de cafeína y trigonelina en *C. arabica* L.

Para comprobar la efectividad del método cromatográfico, se analizaron las muestras de “Café” tostado de la variedad *bourbon*, se observó que los picos correspondientes a los metabolitos de interés se encontraron libres de interferencias, por lo que demuestra que el método fue eficiente para separar los compuestos, se realizaron los cálculos correspondientes (Ver Anexo N°14) y en la tabla N°32, se muestran los valores obtenidos de cafeína y trigonelina en “Café”.

Tabla N°32. Cantidad de cafeína y trigonelina determinada por HPLD-DAD.

Muestra "Café"	Peso de muestra	Área Cafeína	[µg/mL]	Promedio (µg/mL)	Cafeína en "Café" tostado	% cafeína en "Café"
(1)	8.253	254.723	336.96	354.83	6.124 mg/g	0.612
(2)	8.251	275.093	363.90		6.615 mg/g	0.661
(3)	8.253	274.884	363.62		6.608 mg/g	0.660
Muestra "café"	Peso de muestra	Área Trigonelina	[µg/mL]	Promedio (µg/mL)	Trigonelina en "café" tostado	% trigonelina en "café"
(1)	8.253 g	168.007	392.25	352.67	7.129 mg/g	0.712
(2)	8.258 g	140.783	331.11		6.014 mg/g	0.601
(3)	8.252 g	144.038	336.66		6.119 mg/g	0.611

Fuente: Elaboración propia.

Existen variaciones importantes en la concentración de los componentes del "Café", según su variedad y el tostado de grano. Es por ello por lo que los valores con los cuales se comparan los resultados son específicos de la variedad seleccionada para el estudio. En la determinación del contenido de cafeína en la muestra de "Café", los rangos presentaron valores entre 0.612 a 0.661 %. De acuerdo con el Reglamento Técnico Salvadoreño, se exige un mínimo de cafeína de 0.4% en cafés sin descafeinar,<sup>(39,41)</sup> por lo que se puede decir que los datos obtenidos concuerdan con los valores aceptados que se presentan en la especie de *Coffea arabica* L.

Para trigonelina, se documenta que existe a mayor nivel en las especies Arábicas, para "Café" tostados, los rangos aceptados oscilan entre 0.6-1.3 %. En la determinación del contenido de trigonelina, se presentaron valores que van desde 0.796-1.398%, lo que demuestra que los resultados del análisis realizado, se encuentra dentro de los valores típicos aceptados según la literatura.<sup>(42,44)</sup>

Los estudios de cuantificación de metabolitos secundarios en la especie de *Coffea arabica* L, da un mayor enfoque a la relación directa que existe entre la composición química del “Café” y sus características organolépticas, ya que gracias a la presencia de cafeína se determina significativamente la calidad, el aroma y el sabor del “Café” <sup>(45)</sup>, y en cuanto a la presencia de trigonelina, es el amargor del “Café”, la principal característica que se le es atribuida<sup>(46)</sup>.

Entre las principales acciones asociadas al uso del “Café”, se mencionan el proteger al cuerpo humano de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares por el efecto antioxidante, también puede reducir el riesgo a desarrollar diabetes mellitus y estimula el sistema nervioso central, aumentando la capacidad de alerta, mejora la concentración y disminuye la somnolencia<sup>(47)</sup>. También tiene capacidad vasoconstrictora, evitando coágulos sanguíneos y ayudando en el tratamiento de la migraña. Por otro lado, es analgésico, broncodilatador <sup>(48)</sup>, ayuda en la digestión, tiene propiedades diuréticas y ayuda prevenir infecciones urinarias<sup>(49)</sup>.

Es por esto por lo que el estudio del contenido de los metabolitos secundarios de cafeína y trigonelina desde el punto de vista farmacológico también es muy importante, ya que, mediante el desarrollo del método de cuantificación, se puede llevar a cabo una segura utilización de los principios activos responsables de las propiedades terapéuticas, de la especie vegetal. Y da paso al futuro desarrollo y formulación de medicamentos y cosméticos que en su composición tengan como base a cafeína y trigonelina.



**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. Un total de 6 extractos, 3 de hojas y 3 de corteza de *P. schiedeana* Ness, evidencian en los resultados, la obtención de porcentajes de rendimiento, con una clara distinción entre los extractos y fue el extracto etanólico de hojas que presentó un rendimiento del 15.40%, lo que indica afinidad con el solvente de extracción utilizado. A partir de los resultados obtenidos, se cuantificó la cantidad de escopoletina encontrada en los extractos, y se encontró que fue el extracto etanólico de hojas de *P. schiedeana* Ness el que presentó una mayor cantidad del metabolito secundario.
2. A partir de los resultados obtenidos en el LIPN, para el desarrollo del método para cuantificar escopoletina en *P. schiedeana* Ness, se seleccionan las condiciones experimentales más favorables para llevar a cabo esta determinación, las cuales son: fase móvil A: agua: ácido acético (1:10) y B: Metanol, método gradiente, longitud de onda a 348 nm y un flujo de 1 mL/min.
3. Para evaluar la efectividad de la metodología analítica, se verifican los principales parámetros de validación para el método de cuantificación de escopoletina en *P. schiedeana* Ness, y de cafeína y trigonelina en *C. arabica* L, se realizaron empleando las recomendaciones de la ICH, los resultados obtenidos permiten concluir que el método es lineal, exacto y preciso, en los rangos de concentraciones escogidos respectivamente para cada metabolito, es por ello que se puede afirmar que el método presenta características que verifican la capacidad del proceso analítico.

4. Para la determinación cuantitativa de cafeína y trigonelina en *Coffea arabica* L, se adaptó, una metodología analítica por HPLC-DAD, que desarrollada con anterioridad por el departamento de Agroindustria en Universidad Zamorano, Honduras, tomando en cuenta las mejores condiciones experimentales, tales como el uso de fase móvil A: agua: ácido acético (1:10), método isocrático A:95% y B:5%, longitud de onda de 266 nm y flujo de 1 mL/ min. Y se demostró que el método fue aplicable para las condiciones y muestras del LIPN.
  
5. Para cafeína y trigonelina, con las áreas de los cromatogramas obtenidos y la ecuación de la curva calibración obtenidas, se obtuvo la cantidad de cafeína contenida en las muestras de café tostado, con un porcentaje de rendimiento que oscila entre 0.660-0.612%. Y para trigonelina, se obtuvo la cantidad contenida en las muestras de café tostado, con un porcentaje de rendimiento que oscila entre 0.601-0.712%.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. A fin de conseguir el mayor rendimiento en la obtención de metabolito secundario de escopoletina en *P. schiedeana* Ness, se recomienda utilizar como solvente de extracción etanol.
2. Para la recolección y almacenamiento de las especies vegetales de *P. schiedeana* Ness y *C. arabica* L, es importante mantener las condiciones adecuadas, como la ausencia de luz y calor, para que las muestras no sufran alteración en su composición química.
3. Estándares, blancos, fases móviles y muestras, deben ser filtrados con filtro de 045  $\mu\text{m}$ , al no realizarlo, el filtro de entrada de HPLC puede ser obstruido, lo cual reduce el rendimiento de la bomba, se observan picos superpuestos y se mueve el tiempo de retención.
4. Fundamental desgasificar las fases móviles, mediante un sistema desgasificador por vacío, para evitar saturación y formación de burbujas que afecte la línea base del análisis.
5. Para la cuantificación de cafeína y trigonelina, se recomienda preparar las infusiones el mismo día que se lleva a cabo la determinación.
6. En futuras investigaciones, realizar cuantificación de cafeína y trigonelina por HPLC-DAD en diferentes especies de café, y hacer comparación con los resultados obtenidos según su especie, con finalidad de evaluar la calidad sensorial del café.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cruz N s. Á, Serrano AJB. Tecnología Farmacéutica. 978th-84th–994th ed. San Vicente (Alicante), España: Editorial Club Universitario.; 2012.
2. Dewick PM. Medicinal Natural Products: A Biosyntese Approach. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2009. 310–312 p.
3. Ávalos García Elena Pérez-Urria Carril A. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal. 2009;2(3):119–45.
4. Puigdomènech i Rosell P. La Biotecnologia vegetal. Treballs de la Societat catalana de biología. 2009;11(4):79-86–86.
5. G. AA. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
6. Jaime G, Acosta A. Universidad de Antioquia. Alcaloides y compuestos nitrogenados.
7. Ramón-Gonçalves M, Gómez-Mejía E, Rosales-Conrado N, León-González ME, Madrid Y. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. Waste Management. 2019; 96:15–24.
8. Kuklinski C. Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Gráfic A& M, editor. Barcelona: Ediciones Omega, S.A; 2000. Capítulo 2. Obtención y recolección.
9. Pino-Rodríguez S, Prieto-González S, Pérez-Rodríguez ME, Molina-Torres J. Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. 2004;23(2):252–8.
10. Sánchez-hoyos F, Cárdenas A, Mercado-camargo J, Domínguez- G, Gómez-Estarada H. Validation of an analytical HPLC method for the quantification. 2016;45(3):470–83.

11. Caballero B. MY. Determinación de los factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la calidad del café de Inversiones Galavis en 2018-2019. Universidad de Santander “UDES”; 2019.
12. Café RF. El café de El Salvador. 2020;
13. PROCAGICA. Guía Práctica de Caficultura. Ministerio de Agricultura y Ganadería.
14. International Coffee Organization - Aspectos botánicos [Internet]. [cited 2022 Jun 19]. Available from: [https://www.ico.org/es/botanical\\_c.asp](https://www.ico.org/es/botanical_c.asp)
15. Fonseca F, Nello T, Raes L, Saborío J, Chacón Ó. Guía técnica para la restauración en El Salvador Renovación de cafetales [Internet]. Available from: [www.iucn.org/ormacc](http://www.iucn.org/ormacc)
16. Agroindustria CDE. Caracterización física y química del fruto y. 2003;
17. Yasir M, Das S, Kharya M. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. Pharmacognosy Reviews. 2010;4(7):77–84.
18. Camargo A, Torres LE. Validación de métodos analíticos: Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Paho. 2002;1–83.
19. Sánchez AM. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina [Doctorado]. [Tarragona]: Universitat Rovira I Virgili; 2002.
20. Luna Ventura NM. Validacion Del Metodo De Cuantificacion De Vitamina a (Retinol) En Azucar Moreno Por Espectrofotometria Ultravioleta / Visible. 2013;53(9):1689–99.
21. Cortes J. G 9.6 Validación de métodos analíticos fisicoquímicos. Vol. 02. El Salvador; 2017.
22. J. G. Mejía, S. Vásquez R. Salazar, L. Muñoz, U. Guardado Castillo, A. D. Paz-González, G. Rivera, M. J. Núñez, M. A. Moreno. Analgesic activity and phytochemical profile of aqueous, ethanol and dichloromethane extracts of *Persea schiedeana* leaves. 2021;12(8):4167–73.
23. Sacristán San Cristóbal, Eva María Díaz Peña. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones

teórico-prácticas. Parte III. Práctica de laboratorio: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil. 2011;4(3):48–78.

24. Universidad de Alicante. Cromatografía líquida de alta resolución [Internet]. Alicante; [cited 2022 Nov 10]. Available from: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
25. Oliveros-Bastidas A, Cordero I, Paredes D, Buendía D, Macías Domínguez FA. Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC en extractos hidroetanólico de semillas de *Dipteryx odorata* [Internet]. [Mérida]: Universidad de los Andes; 2011. Available from: [www.relaquim.com](http://www.relaquim.com)
26. Sarria Villa RA, Gallo Corredor JA, Benítez Benítez R. Extracción de compuestos fenólicos y contenido de catequina en cortezas de tres especies forestales del Cauca-Colombia. *Entre ciencia e ingeniería*. 2021 Jun 30;15(29):19–27.
27. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich harmonized tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).
28. Organismo Salvadoreño de acreditación. G 9.6 Validación de métodos analíticos fisicoquímicos. 2017.
29. Yasir M, Das S, Kharya M. The phytochemical and pharmacological profile of *persea americana* Mill. Vol. 4, *Pharmacognosy Reviews*. 2010. p. 77–84.
30. Adeyemi OO, Okpo SO, Ogunti OO. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). Lagos; 2002 Mar.
31. Álvarez JM, Cuca LE, Carrasco-Pancorbo A, Ruiz-Muelle AB, Fernández I, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (Lauraceae). *Biochem Syst Ecol*. 2016 Aug 1; 67:53–7.



32. Patel P, Raval M, Patel N, Patel S, Vyas N, Patel A. Quantification of Scopoletin from the Roots of *Argyrea Speciosa* (Linn. F) Sweet Using HPLC Through the Concept of Design of Experiment. *J AOAC Int.* 2021 Aug 20;104(4):1167–80.
33. Humbeck K. “Studies on Scopolin and Scopoletin Stress Induced Accumulation and Regulatory Elements.” Halle; 2013 Dec.
34. Gnonlonfin GJB, Sanni A, Brimer L. Review Scopoletin - A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2012 Jan;31(1):47–56.
35. Bhuyan DJ, Alsherbiny MA, Perera S, Low M, Basu A, Devi OA, et al. The odyssey of bioactive compounds in Avocado (*Persea Americana*) and their health benefits. Vol. 8, Antioxidants. MDPI; 2019.
36. SCAA Protocols | Cupping Specialty Coffee Published by the Specialty Coffee Association of America (SCAA).
37. Castillo UG, Joachin EA, Martínez ML, Velásquez E, Pacas L, Núñez MJ. Antioxidant capacity and caffeine content in specialty coffees from El Salvador [Internet]. Available from: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>
38. Guy RC. International Conference on Harmonisation. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition.* 2014;2(June 1995):1070–2.
39. Castillo UG, Joachin EA, Martínez ML, Velásquez E, Pacas L, Núñez MJ. Capacidad antioxidante y contenido cafeína en Cafés especiales de El Salvador. *Revista Minerva* [Internet]. 2021 jun;76. Available from: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>
40. Consejo Salvadoreño del Café. Capacidad antioxidantes y contenido de cafés especiales de El Salvador. *Revista Minerva.* 2021;(4):75–84.
41. Aznar SC, Barcelona. Determinación de Cafeína en productos Comerciales. University Polytechnical of Catalunya, Barcelona; 2011.

42. Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noiro M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. ELSEVIER. 2001
43. Sualeh A, Tolessa K, Mohammed A. Biochemical composition of green and roasted coffee beans and their association with coffee quality from different districts of southwest Ethiopia. Heliyon. 2020 Dec 1;6(12).
44. Clifford MN. Composición granos café verde y tostado. 1975. p. 13–6.
45. Martínez, Morena Lizette UGCMJN. Determinación de la correlación existente entre el contenido químico y calidad en taza de café (*Coffea arabica*) producido en la cordillera de Apaneca-Lamatepec, El Salvador. SIC-UES. 2021;2–5.
46. Roberto J, Bóbeda L. Cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). 2008;
47. Siedentopp U. Coffee - Pharmaceutical drug and mild stimulant. Revista Internacional de Acupuntura. 2009;3(3):143–7.
48. MA. H. Fármacos antiasmáticos y broncodilatadores. farmacología Humana. 4ª edición. Flórez J A, JÁ, Mediavilla A Editores, Barcelona; 2003. p. 729-43.
49. Ramírez P. DM. Café, cafeína vs. Salud; Revisión de los efectos del consumo de café en la salud. Revista centro de estudios en salud. 2010;1(12):156–67.

## **ANEXOS**

## ANEXO N°1.

Tabla N° 33. Material, equipos y reactivos a utilizados en laboratorio de investigación de productos naturales.

Materiales		Equipos	Reactivos
Embudos	Beakers 100 mL, 250 mL y 500 mL	Molino de café marca Mahlkönig, modelo K32510.	Etanol >96%
Viales para muestras de HPLC	Termómetro	Evaporador rotativo digital (marca Yamato serie RE301)	Agua ultrapura
Jeringas de 1 mL Y 5 mL	Papel filtro Whatman poro grueso	Cromatógrafo Líquido de Alta Presión modelo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Alemania).	Ácido acético glacial >99.9%
Filtros de Nylon 0.45 µL Thermo scientific	Balones volumétrico 10 mL	Horno marca Thermo Scientific N° de serie 41677777	Hexano >99.9%
Equipo de Filtración de solvente	Probetas de 10 mL	Sonicador marca VWR modelo 97043-940	Acetonitrilo HPLC
Micropipeta 100-1000 µL	Micropipeta 10-100 µL	Balanza analítica marca Shimadzu, modelo TW423L	Metanol HPLC
		Balanza de precisión Ohaus Explorer ® Precision Balance modelo OBX-223	
Embudo	Micropipeta 1-10 µL	Genevac™, Serie EZ-2	

Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO N°2.

Esquema de trabajo de parte experimental con especie vegetal *Persea schiedeana* Ness.

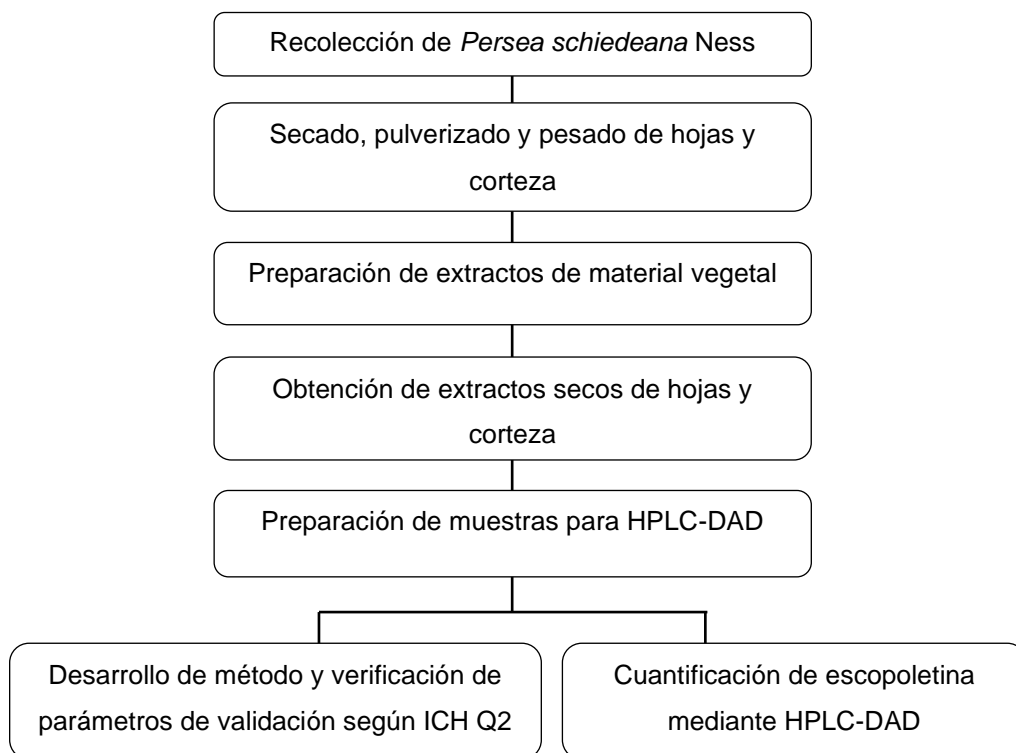


Figura N°11. Esquema de trabajo con *P. schiedeana* Ness

Fuente: Elaboración propia.

### ANEXO N°3.

Preparación de curva de calibración para cuantificación de escopoletina

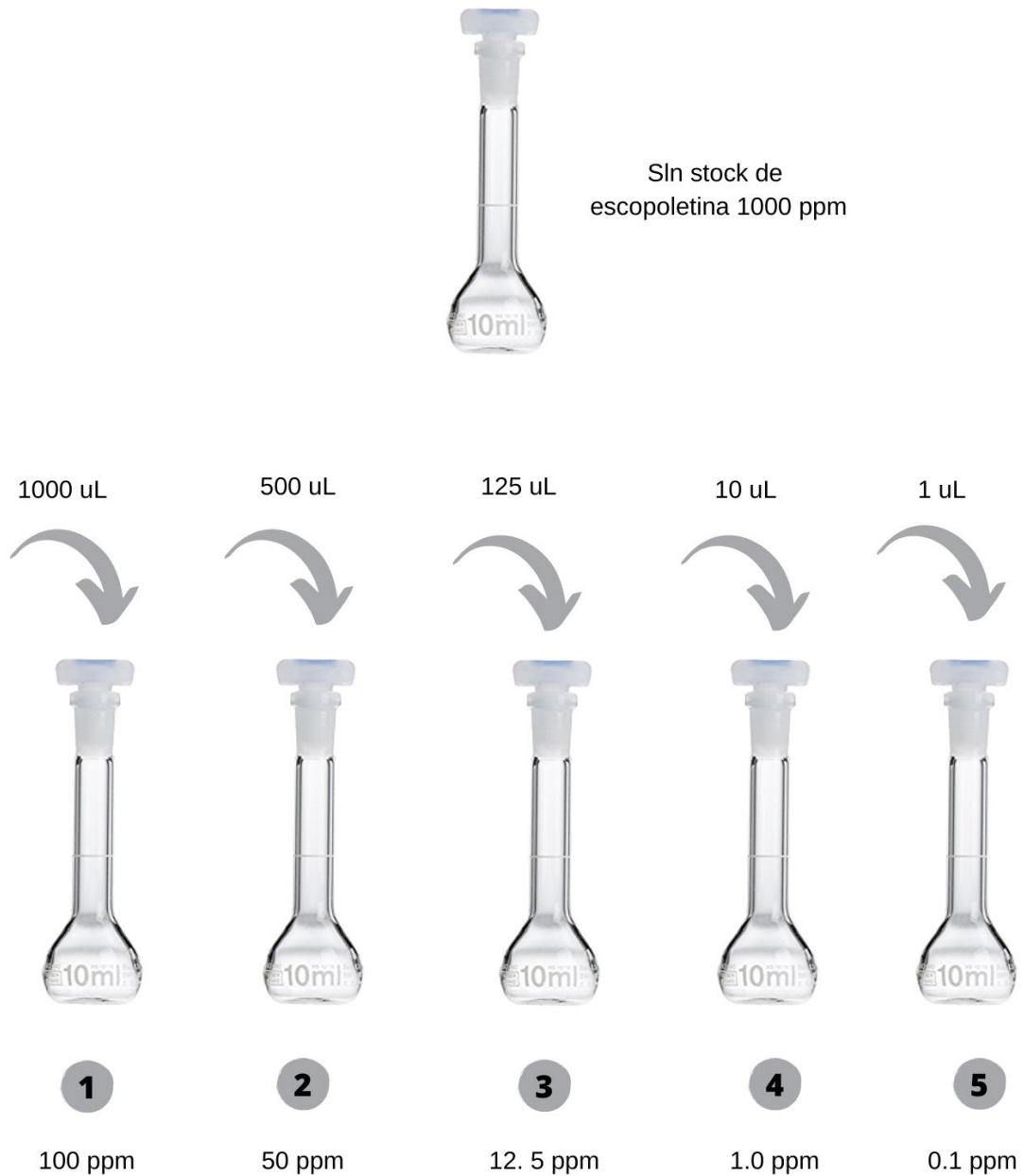


Figura N°12. Curva de calibración para cuantificación de escopoletina.

Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO N°4.

### Preparación de fases móviles.

Preparar una mezcla para fase móvil, utilizando ácido acético HPLC y Agua ultrapura

Medir 10 mL de ácido acético y agregarlos a una probeta de 1,000 mL



Filtrar la solución

Armar kit de filtración por succión al vacío



Sonicar la sln. filtrada por 15 min



Colocar la sln. filtrada y desgasificada en equipo HPLC

Figura N° 13. Elaboración de fase móvil.

Fuente: Elaboración propia.

## Anexo N°5.

Esquema de trabajo de parte experimental con especie vegetal *Coffea arabica* L.

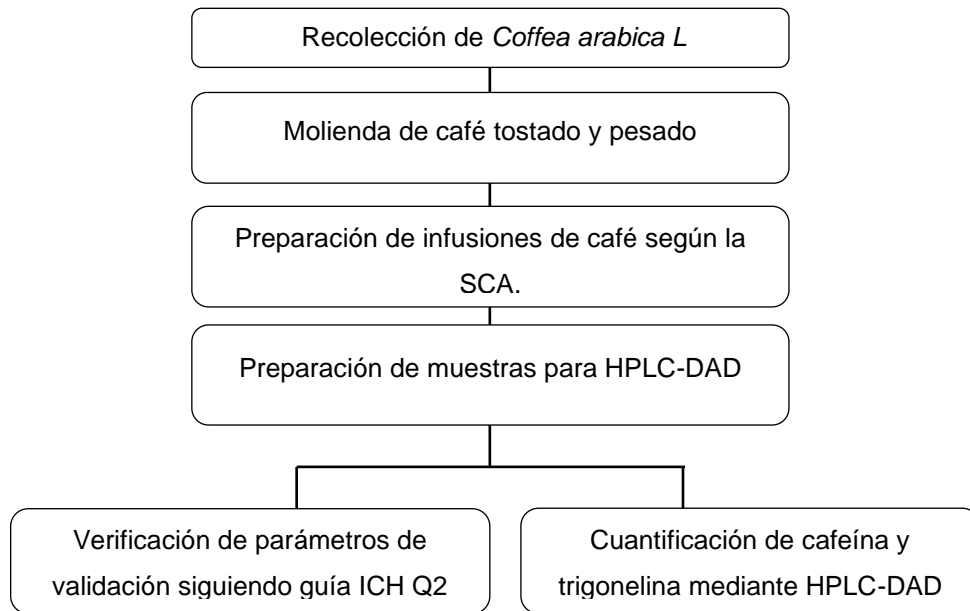


Figura N°14. Esquema de trabajo con *C. arabica* L.

Fuente: Elaboración propia.



## ANEXO N°6.

### Preparación de curva de calibración para cuantificación de cafeína y trigonelina

Alícuotas a tomar a partir de soluciones stock para preparación simultánea de estándares

Sln Stock	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
Cafeína	1000 $\mu$ L	750 $\mu$ L	500 $\mu$ L	100 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Trigonelina	4000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	1500 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	500 $\mu$ L

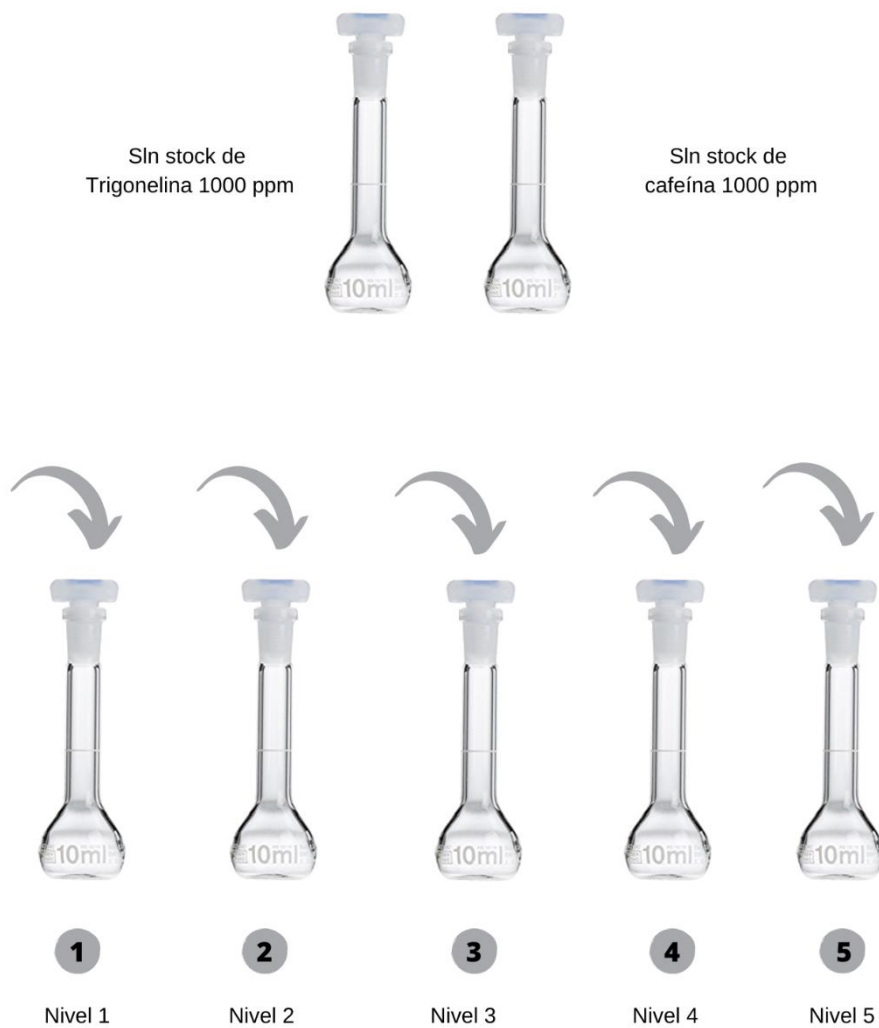


Figura N°15. Curva de calibración para cuantificación de cafeína y trigonelina.

Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO N°7.

Tabla N°34. Parámetros a determinar en validación de métodos analíticos

Parámetros a determinar	Determinación		Formulas
Linealidad	[Nivel]	N° Reps.	Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vrs respuesta analítica, positiva.  $r^2 \geq 0.98$
	1	3	
	2	3	
	3	3	
	4	3	
	5	3	
Repetibilidad	[Estándar]	N° Reps.	$DS = \frac{\sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2}}{n - 1}$ $CV = \frac{DS}{Y} \times 100$
Precisión Intermedia	Utilizar un mínimo de 3 niveles de concentración que cubran el rango especificado de la metodología analítica.	Debe evaluarse utilizando un mínimo de 9 determinaciones.	
Exactitud			
Límite de detección	Preparar una serie de blancos y analizar según el método que se esté evaluando. Se calcula la desviación estándar de las respuestas.		$LD = \frac{3 \times DS}{X_b}$ <b>DS</b> =Desviación estándar de la respuesta <b>X<sub>b</sub></b> = Promedio de lectura de 10 blancos
Límite de cuantificación			$LC = \frac{6 \times DS}{X_b}$ <b>DS</b> =Desviación estándar de la respuesta <b>X<sub>b</sub></b> = Promedio de lectura de 10 blancos
Selectividad de método	Utilizar los resultados de las técnicas confirmatorias para evaluar la capacidad del método y confirmar la identidad del analito y su capacidad para medir el analito aislado de otras interferencias.		

Fuente: Elaboración propia.

### Anexo N°8.

Cromatogramas de extracto etanólico de hojas de *P. schiedeana* Ness.

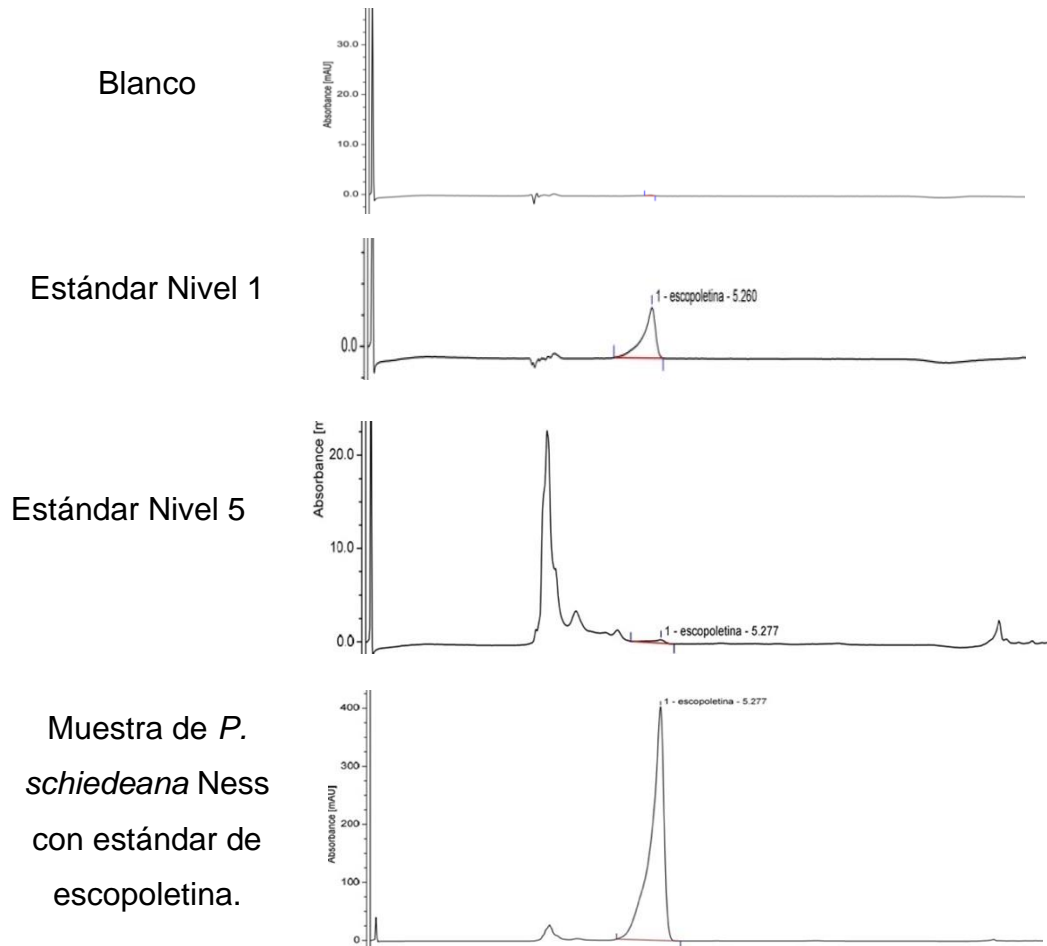


Figura N° 16. Cromatogramas de extracto etanólico de hojas de *P. schiedeana* Ness.

Fuente: Elaboración propia.

# ANEXO N°9. Certificado de análisis de estándar de escopoletina.

**SIGMA-ALDRICH®**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

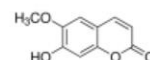
Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

## Certificate of Analysis

Product Name:  
Scopoletin - ≥99%

**Product Number:** S2500  
**Batch Number:** MKCM0255  
**Brand:** SIGMA  
**CAS Number:** 92-61-5  
**MDL Number:** MFCD00006872  
**Formula:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>  
**Formula Weight:** 192.17 g/mol  
**Quality Release Date:** 10 MAR 2020



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Faint Yellow to Yellow	Light Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Yellow to Yellow-Green	Dark Yellow
Solubility (Turbidity) 50 mg/ml, Pyridine	Clear to Very Slightly Hazy	Very Slightly Hazy
Purity (TLC)	≥ 99 %	> 99 %
EmM in EtOH	12.2 - 13.2	13.1
Wavelength Lambda Max	345 - 347 nm	347 nm

Michael Grady, Manager  
Quality Control  
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

**ANEXO N°10**

**Cálculo para cuantificación de escopoletina.**

## ANEXO N°10.

Cálculo para cuantificación de escopoletina.

Para comprobar la efectividad del método cromatográfico, se analizaron las muestras. De los datos obtenidos de las lecturas de HPLC-DAD, se realizan los respectivos cálculos para determinar el contenido de escopoletina que hay en cada extracto.

Donde:

Área=0.039

Conc. Escopoletina= 0.3300 µg/mL

SD= 0.0036

Concentración de extracto = 1mg / mL

- Cantidad de escopoletina en cada gramo de extracto seco de hojas de *P. schiedeana*

$$0.3300 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ mg de ext. seco}} = 0.3300 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \text{ extracto seco}$$

$$0.3300 \mu\text{g} \rightarrow 1 \text{ mg extrac. seco}$$

$$x \mu\text{g} \rightarrow 1,000 \text{ mg}$$

$$x = 330.0 \frac{\mu\text{g}}{\text{g de ext. seco}} \text{ ó } 0.3300 \frac{\text{mg}}{\text{g extr. seco}}$$

- Cantidad de escopoletina presente en 100 g de hojas secas de *P. schiedeana*

$$0.3300 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \frac{2.4790 \text{ g de ext. seco}}{50 \text{ g de hoja seca}} \times 100 \text{ g}$$

$$1.6361 \frac{\text{mg de escopoletina}}{100 \text{ g de hoja seca}}$$

**Nota:** Se realizo el mismo procedimiento, para cada uno de los extractos, utilizando sus respectivos datos.

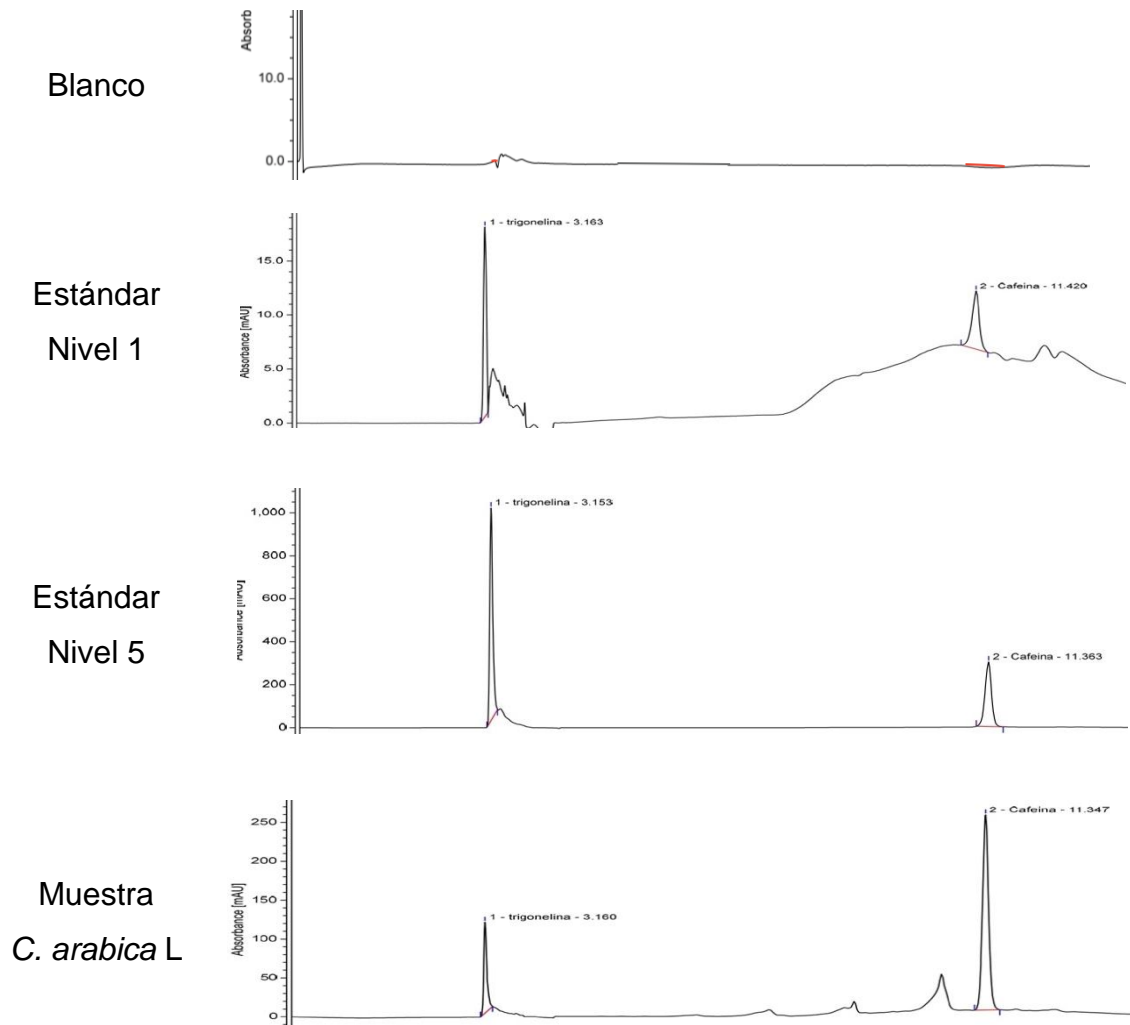
**ANEXO N°11.**

**Cromatogramas de muestras de granos tostados de *C.*  
*arabica* L.**



## ANEXO N°11.

Cromatogramas de muestras de granos tostados de *C. arabica* L.



Muestra C.  
*arabica* L  
con  
estándar de  
cafeína



Muestra C.  
*arabica* L  
con  
estándar de  
trigonelina

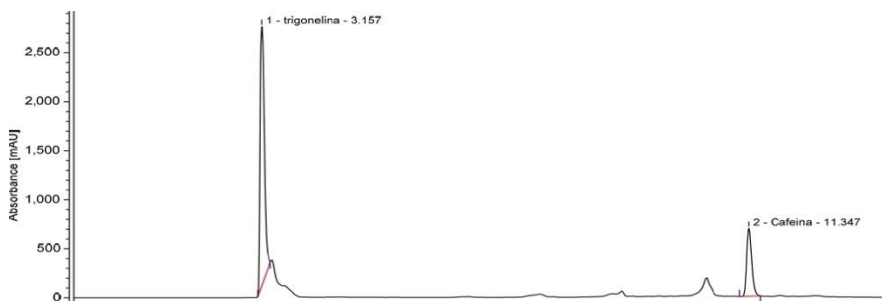


Figura N° 17. Cromatogramas de muestras de granos tostados de *C. arabica* L.

Fuente: Elaboración propia.

# ANEXO N°12. Certificado de análisis de estándar de cafeína.



## Certificate of Analysis

1 Reagent Lane  
Fair Lawn, NJ 07410  
201.796.7100 tel  
201.796.1329 fax

Thermo Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System  
Standard ISO9001:2015 by SAI Global Certificate Number CERT – 0120632

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Thermo Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Products are for research use or further manufacturing. Not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the final formulator and end user to determine suitability based upon the intended use of the end product. Products are tested to meet the analytical requirements of the noted grade. The following information is the actual analytical results obtained.

Catalog Number	O1728	Quality Test / Release Date	06/11/2021
Lot Number	211689		
Description	CAFFEINE, ANHYDROUS, USP/FCC		
Country of Origin	India	Suggested Retest Date	Jun/2024
Chemical Origin	Organic - non animal		

FCC Grade			
Result Name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	WHITE POWDER
ASSAY	%	Inclusive Between 98.5 - 101.0	100.2
CARBONIZABLE SUBSTANCES	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
IDENTIFICATION (ALL LISTED)	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
IGNITION RESIDUE	%	<= 0.1	0.1
LEAD (Pb)	MG/KG	<= 1	1
OTHER ALKALOIDS	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
WATER	%	<= 0.5	<0.5

USP Grade			
Result Name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	WHITE POWDER
ASSAY	%	Inclusive Between 98.5 - 101.0	100.1
IDENTIFICATION (ALL LISTED)	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
IGNITION RESIDUE	%	<= 0.1	<0.1
RESIDUAL SOLVENTS	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
USP INDIVIDUAL IMPURITY	%	<= 0.1	<0.1
USP TOTAL IMPURITY	%	<= 0.1	<0.1
WATER	%	<= 0.5	<0.5

Residual Solvents	No Class 1 or Class 3 solvents are used in the manufacturing process. Class 2 solvent chloroform is used in the process but is not detected in the final product due to the process used.
-------------------	---

*Julian Burton*

Julian Burton - Quality Control Manager – Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as an extension of this catalog number listed above.  
If there are any questions with this certificate, please call at (800) 227-6701.

\*Based on suggested storage condition.

## ANEXO N°13. Certificado de análisis de estándar de trigonelina.

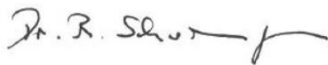
**SIGMA-ALDRICH**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

### Certificate of Analysis

**Product Name:** Trigonelline hydrochloride  
analytical standard  
**Product Number:** T5509  
**Batch Number:** BCCB9514  
**Brand:** Sigma-Aldrich  
**CAS Number:** 6138-41-6  
**Formula:**  $C_7H_7NO_2 \cdot HCl$   
**Formula Weight:** 173.60  
**Quality Release Date:** 02 SEP 2019

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
ARGENTOMETR. TITRATION	97.5 - 102.5 %	100.2 %
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	100 MG/ML OF WATER	100 MG/ML OF WATER
CARBON CONTENT	47.2 - 49.6 %	47.9 %
NITROGEN CONTENT	7.7 - 8.3 %	7.8 %



Dr. Reinhold Schwenninger  
Quality Assurance  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

#### ANEXO N°14.

Cálculo para cuantificar contenido de cafeína en  
infusión de granos de café tostado de *Coffea arabica* L.

Para comprobar la efectividad del método cromatográfico, se analizaron las muestras. De los datos obtenidos de las lecturas de HPLC-DAD, se realizan los respectivos cálculos para determinar el contenido de escopoletina que hay en cada extracto.

Donde:

Área=254.723

Conc. Cafeína = 336.96 µg/mL

Pesaje inicial de café molido=8.253 g

Volumen<sub>H<sub>2</sub>O</sub>Ultrapura= 150 mL

- Cantidad de cafeína en infusión de café realizada.

$$336.96 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{150 \text{ mL de H}_2\text{O}}{8.253 \text{ g de café}} = 6124.318 \frac{\mu\text{g}}{\text{g de café}}$$

$$6124.318 \mu\text{g} \rightarrow 1 \text{ mg}$$

$$x \mu\text{g} \rightarrow 1,000 \text{ mg}$$

$$6.124 \frac{\text{mg de cafeína}}{\text{g de café}}$$

$$6.124 \text{ mg} \rightarrow 100 \text{ g}$$

$$x \mu\text{g} \rightarrow 1,000 \text{ g}$$

**0.614 % cafeína en café tostado**

**Nota:** Se realizó el mismo procedimiento para cafeína y trigonelina, con cada una de las infusiones realizadas.