



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Validación de un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) para la determinación y cuantificación de carnosol obtenido de la especie *Lepechinia mutica*.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Loja González, Corina Brigette

DIRECTORA: Solano Cueva, Natalí Elizabeth, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2019



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2019

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Natalí Elizabeth Solano Cueva

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Validación de un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) para la determinación y cuantificación de carnosol obtenido de la especie *Lepechinia mutica*”** realizado por **Loja González Corina Brigette** ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Abril 2019

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Loja González Corina Brigette declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Validación de un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) para la determinación y cuantificación de carnosol obtenido de la especie *Lepechinia mutica***, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo **Mgtr. Natalí Elizabeth Solano Cueva** directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autora: Loja González Corina Brigette

Cédula: 1150171633

DEDICATORIA

A Jorge y Lucía.

Todo lo que hago es por y para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres y hermanos, por su amor infinito.

A todos mis compañeros, que a lo largo de carrera hemos podido forjar un lazo de amistad incondicional.

A Mgtr. Natalí Solano por su dirección en este trabajo de titulación, por su paciencia y comprensión.

Al Departamento de Química y Docentes en general por todo el conocimiento impartido en el transcurso de la carrera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes.....	5
1.1.1. Uso de plantas en la medicina tradicional.....	5
1.1.2. Plantas medicinales en Ecuador.....	5
1.2. Descripción de especie <i>Lepechinia mutica</i> Benth.....	5
1.2.1. Metabolitos secundarios.....	6
1.2.2. Carnosol.....	6
1.3. Técnica de obtención de extracto de material vegetal.....	7
1.3.1. Recolección de material vegetal.....	7
1.3.2. Maceración.....	7
1.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).....	8
1.4.1. Descripción del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	8
1.4.2. Detectores.....	8
1.4.2.1. Detectores generales.....	9
1.4.2.2. Detectores selectivos.....	9
1.4.3. Espectrometría de masas.....	9
1.5. Validación de métodos analíticos.....	9
1.5.2. Linealidad.....	10
1.5.3. Límite de detección (LOD).....	10
1.5.4. Límite de cuantificación (LOQ).....	10
1.5.5. Exactitud.....	10

1.5.6.	Precisión.	10
1.5.7.	Repetibilidad.	10
1.5.8.	Reproducibilidad.	11
1.5.9.	Recuperación.	11
CAPÍTULO II.		12
MATERIALES Y MÉTODOS.		12
2.1.	Esquema metodológico empleado.	13
2.2.	Recolección del material vegetal.	13
2.3.	Secado y triturado del material vegetal.	14
2.4.	Maceración.	14
2.5.	Optimización de condiciones cromatográficas.	14
2.6.	Validación del método analítico.	15
2.6.1.	Preparación de soluciones patrón y muestras.	15
2.6.1.1.	<i>Solución patrón.</i>	15
2.6.1.2.	<i>Preparación de muestra a partir del extracto de L. mutica.</i>	15
2.6.2.	Linealidad.	15
2.6.2.1.	<i>Preparación de estándares.</i>	16
2.6.3.	Límites de cuantificación (LOQ).	16
2.6.4.	Límites de detección (LOD).	16
2.6.5.	Exactitud.	16
2.6.6.	Precisión.	17
2.6.7.	Análisis estadístico.	17
2.7.	Cuantificación de carnosol.	18
CAPÍTULO III.		19
RESULTADOS.		19
3.1.	Extracto de <i>Lepechinia mutica</i>	20
3.2.	Especificidad del método.	20
3.3.	Validación del método.	21
3.3.1.	Rango de trabajo.	21
3.3.2.	Linealidad.	22
3.3.3.	Límite de detección y de cuantificación.	23
3.3.4.	Precisión.	23
3.3.4.1.	<i>Repetibilidad y Reproducibilidad.</i>	23
3.3.5.	Exactitud.	24
3.3.5.1.	<i>Recuperación.</i>	24

3.4. Cuantificación de carnosol.....	26
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES	28
BIBLIOGRAFIA.....	29
ANEXOS.....	35
Anexo I. Diagrama de preparacion de estandares para método analítico.	36
Anexo II. Cálculo del rendimiento del extracto obtenido de la especie <i>Lepechinia mutica</i>	37
Anexo III. Determinación de Linealidad.....	38
Anexo IV. Datos para determinar límite de detección y cuantificación.	41
Anexo V. Determinación de precisión.	42
Anexo VI. Determinación de porcentaje de recuperación.....	44
Anexo VII. Cuantificación de carnosol.....	46
Anexo VIII. Método de ensayo: Determinación de carnosol	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Uso de plantas en la medicina tradicional.....	6
Tabla 2. Condiciones cromatográficas.....	15
Tabla 3. Rendimiento del extracto obtenido de especie <i>Lepechinia mutica</i>	20
Tabla 4. Datos para la curva de calibración de carnosol.....	22
Tabla 5. Resultados obtenidos de la lectura de blancos.	23
Tabla 6. Repetibilidad del método.	23
Tabla 7. Reproducibilidad del método.	24
Tabla 8. Valor de F calculado.	24
Tabla 9. Porcentaje de recuperación.	25
Tabla 10. Síntesis de los resultados obtenidos en el proceso de validación.	26
Tabla 11. Cuantificación de carnosol.....	26
Tabla 12. Datos para la determinación de linealidad.	39
Tabla 13. Determinación de pendiente e intercepto de la curva de calibración.....	39
Tabla 14. Datos para determinar el coeficiente de correlación de carnosol.	40
Tabla 15. Pendientes e interceptos de carnosol.	40
Tabla 16. Resultados obtenidos de la lectura de blancos.	41
Tabla 17. Datos obtenidos para determinación de repetibilidad.....	42
Tabla 18. Datos obtenidos para determinación de reproducibilidad.....	42
Tabla 19. Análisis ANOVA para determinación de precisión del método.	43
Tabla 20. Porcentaje de Repetibilidad y Reproducibilidad.	43
Tabla 21. Datos obtenidos para determinación de porcentaje de recuperación.....	45
Tabla 22. Tabla de reactivos empleados	47
Tabla 23. Condiciones cromatográficas para determinación de carnosol.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especie <i>Lepechinia mutica</i>	6
Figura 2. Estructura química del carnosol.	7
Figura 3. Componentes del equipo de cromatográfico HPLC.....	8
Figura 4. Esquema de obtención de extracto acético de la especie <i>Lepechinia mutica</i>	13
Figura 5. Esquema de validación del método analítico.....	13
Figura 6. Zona de recolección del material vegetal.	14
Figura 7. Maceración y filtración del material vegetal.....	14
Figura 8. Extracto total de especie <i>Lepechinia mutica</i>	20
Figura 9. Cromatograma de carnosol.....	21
Figura 10. Espectro de carnosol.....	21
Figura 11. Linealidad del método para determinación de carnosol.....	22
Figura 12. Gráfica control del carnosol.....	25
Figura 13. Curvas de calibración realizadas para determinación de linealidad.....	38
Figura 14. Curva de calibración de carnosol.	48
Figura 15. Preparación de estándares para la curva de calibración.	49

RESUMEN

A través del desarrollo de un método analítico, se determinó cuantitativamente la presencia de carnosol en extracto de acetato de etilo obtenido de la especie *Lepechinia mutica*. El método empleado cumple con los parámetros establecidos de linealidad ($r^2= 0,9995$), límite de detección (38,71 ng/μl) y límite de cuantificación (58,91 ng/μl). En base al análisis de repetibilidad y reproducibilidad se logró determinar la precisión del ensayo, según las normas establecidas, los resultados del coeficiente de variación deben ser menor a 10 y 15% respectivamente, se obtuvo un porcentaje de repetibilidad de 0,97% mientras que para reproducibilidad fue de 0,97 y 0,94%. La exactitud se evaluó mediante el estudio del porcentaje de recuperación, el cual fue de 93 a 112%; debido a que cada parámetro cumple con las condiciones estipuladas, se asegura la calidad del método, concluyendo que es fiable y puede ser aplicado para investigaciones posteriores.

Palabras clave: *Lepechinia mutica*, carnosol, HPLC-MS, validación.

ABSTRACT

Through the development of an analytical method, the presence of carnosol in ethyl acetate extract obtained from the species *Lepechinia mutica* was quantitatively determined. The method used meets the established parameters of linearity ($r^2= 0.9995$), limit of detection (38,71 ng/ μ l) and limit of quantification (58,91 ng/ μ l). Based on the repeatability and reproducibility analysis, it was possible to determine the accuracy of the test, according to the established norms, the results of the variation coefficient must be less than 10 and 15% respectively, a repeatability percentage of 0.97% was obtained, while for reproducibility was 0.97 and 0.94%. Accuracy was assessed by studying the recovery percentage, which was 93 to 112%; because each parameter meets the stipulated conditions, the quality of the method is assured, concluding that it is reliable and can be applied for further investigations.

Keywords: *Lepechinia mutica*, carnosol, HPLC-MS, validation.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad las plantas han sido utilizadas como un recurso benéfico para la salud, dentro de la familia Lamiaceae, se encuentran especies del género *Lepechinia*, que según reportes por Drew y Sytsma (2013) han sido empleadas para el tratamiento de tumores uterinos, dolencias estomacales y diabetes; las hojas de la especie *Lepechinia mutica* tienen su uso particular en el tratamiento de afecciones nerviosas.

Los compuestos que se han identificado en la especie *Lepechinia mutica* son carnosol, viridiflorol, ácido ursólico, ácido oleánico y crisotol (Ramírez et al., 2018). El carnosol aislado por primera vez a partir de la especie *Salvia carnososa*, es un diterpeno fenólico con propiedades antimicrobianas, neuroprotectoras y antifúngicas (Briones, 2017).

Actualmente el carnosol ha sido experimentado en varias líneas celulares comprometidas con el cáncer de mama y próstata. En estudios realizados por Ramírez et al. (2018), el carnosol muestra una poderosa actividad antifúngica contra el hongo patógeno de plantas *Pyricularia oryzae* y contra el hongo dermatofito *Microsporum canis*, de la misma manera se ubica al carnosol como un compuesto líder para estudios sobre relación entre estructura y actividad, así como para el posible desarrollo de derivados bioactivos contra enfermedades neurodegenerativas.

Debido a la importancia terapéutica que posee la especie *Lepechinia mutica* y sus metabolitos secundarios, el presente estudio pretende contribuir con el desarrollo y validación de un método analítico que permita determinar cuantitativamente la presencia de carnosol, de esta manera se establecerá una metodología que pueda ser reproducible dentro del laboratorio y apto para posteriores análisis en los que se obtenga datos precisos y confiables. Los objetivos para lograr el propósito planteado son:

- Determinar un procedimiento de obtención de extracto de acetato de etilo a partir de la especie *Lepechinia mutica*.
- Establecer las condiciones apropiadas en el equipo cromatográfico que permitan validar el proceso analítico para determinar el compuesto de interés.
- Cuantificar la concentración de carnosol presente en el extracto de la especie *Lepechinia mutica*.
- Comprobar la calidad del método analítico a través de la evaluación de parámetros como: linealidad, precisión, exactitud y determinación del límite de detección y de cuantificación.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

1.1.1. Uso de plantas en la medicina tradicional.

Desde la antigüedad, las plantas han contribuido de manera beneficiosa en el ámbito de la salud, sobre todo en países en vías de desarrollo.

Su utilización está basada en la experiencia y forma parte del patrimonio cultural de cada pueblo, constituyendo un conocimiento que se perpetúa en el tiempo y es transmitido de generación en generación (Rondón & Ponte, 2010).

La OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer necesidades de atención primaria a la salud, y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Bermúdez, Oliveira & Velázquez, 2005).

1.1.2. Plantas medicinales en Ecuador.

Ecuador por su alta diversidad biológica y cultural constituye uno de los países con gran potencial en lo referente a la medicina tradicional (Zambrano, Buenaño, Mancera & Jiménez, 2015), pues de las 5172 especies vegetales útiles, el 60% son medicinales (Balslev, De la Torre, Navarrete & Macía, 2008).

Se han desarrollado diversos estudios de especies vegetales principalmente en la región central andina y en la Amazonía, los cuales en su mayoría consisten de la enumeración de plantas que conoce y usa la gente local, así como en la descripción de los sistemas de salud tradicional en comunidades indígenas (Zambrano et al., 2015), los cuales están encaminados al tratamiento de inflamación o infección estomacal, resfrío, afecciones nerviosas, parasitosis, heridas, problemas de circulación entre otras (Barros, Jaramillo, San Martín & D' Armas, 2017; Balslev et al., 2008).

1.2. Descripción de especie *Lepechinia mutica* Benth

La especie vegetal *Lepechinia mutica* perteneciente a la familia Lamiaceae (Tabla 1) es conocida comúnmente como turuyente, este arbusto (Figura 1) es endémico de Ecuador y se encuentra localizado en la provincia de Loja y en áreas cercanas como el cerro Villonaco y nudo de Cajanuma (Montúfar & Pitman, 2004; León, Valencia, Pitman & Endara, 2011).

Tabla 1. Uso de plantas en la medicina tradicional.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Género:	<i>Lepechinia</i>
Especie:	<i>Mutica</i>

Fuente: Montúfar y Pitman, 2004.

Elaboración: Autora, 2019.

Varias comunidades indígenas han empleado las plantas del género *Lepechinia* como antiséptico, en el tratamiento de tumores uterinos, problemas estomacales, control de diabetes mellitus y afecciones nerviosas. (Esteves, Kuster, Barbi & Menezes, 2009; Drew & Sytsma, 2013). Además diversas investigaciones han demostrado que especies de *Lepechinia* presentan actividad hipoglucemiante, antimicrobiana, citotóxica y antioxidante (Esteves et al., 2009).



Figura 1. Especie *Lepechinia mutica*.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

1.2.1. Metabolitos secundarios.

En las hojas de la especie *L. mutica* se han identificado compuestos como carnosol, viridiflorol, ácido ursólico, ácido oleánico y crisotol. (Ramírez et al., 2018), en cuanto al análisis químico del aceite esencial de esta especie se ha demostrado la presencia de 79 compuestos; los hidrocarburos sesquiterpénicos y monoterpénicos son los más abundantes (Ramírez et al, 2017).

1.2.2. Carnosol.

Es un diterpeno fenólico (Krieger-Liszkay, Bily & Birtic, 2017), fue aislado por primera vez en 1942 a partir de *Salvia carnososa* y posee diversas propiedades antimicrobianas, actúa como neuroprotector y antioxidante (Briones, 2017). De acuerdo a estudios realizados por (Ramírez

et al., 2018), el carnosol muestra una poderosa actividad antifúngica contra el hongo patógeno de plantas *Pyricularia oryzae* y contra el hongo dermatofito *Microsporium canis*.

El carnosol ha sido experimentado en varios modelos de líneas celulares que incluyen mama, próstata y leucemia (Johnson, 2011; Wang et al., 2018); además posee la acción de inhabilitar genes metastásicos y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Kashyap et al., 2017; Park et al., 2014).

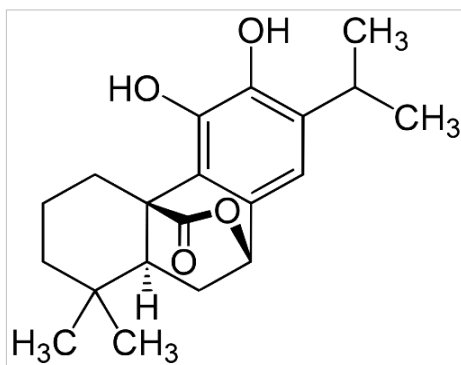


Figura 2. Estructura química del carnosol.

Fuente: Briones, 2017.

Elaboración: Autora, 2019.

1.3. Técnica de obtención de extracto de material vegetal

La extracción de muestras sólidas con solventes es conocida como extracción sólido-líquido, es un método en donde se requiere la utilización de eluyentes convencionales y su posterior eliminación para obtener un extracto concentrado. Los disolventes más utilizados son etanol, metanol, hexano, acetato de etilo o acetona (Tabio, Díaz, Rondón, Fernández & Piloto, 2017; Muñoz et al., 2015).

1.3.1. Recolección de material vegetal.

El material vegetal debe ser recolectado en bolsas o envolturas de papel para mantener la calidad durante su almacenamiento (Sánchez-González & Ledesma, 2007). Se anotaran datos específicos de recolección como: fecha, localidad, altitud y condiciones climáticas (Cires, 2004). En cuanto al secado, el material vegetal puede podrirse o volverse quebradizo si no hay un secado adecuado, Padilla (2018) especifica que para la obtención del extracto de *Lepechinia mutica* esta especie debe ser secada a una temperatura de 35°C por un lapso de tres días.

1.3.2. Maceración.

Es un proceso de extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en poner en contacto el material vegetal, debidamente fragmentado con un solvente, hasta que éste penetre y finalmente disuelva las porciones solubles (González, 2004), dependiendo de la naturaleza de la especie y del solvente, se deja en contacto por varias horas o días. Cuando

esta técnica se realiza en reposo se la conoce como maceración estática, mientras que si se existe agitación se la conoce como maceración dinámica (Florián, 2016). Luego de este proceso se filtra el líquido, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (De la Cruz, 2014).

1.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)

Es una técnica cromatográfica que se puede aplicar a cualquier compuesto con solubilidad en un líquido utilizado como fase móvil. Se usa ampliamente en análisis de alimentos, fármacos, cuantificación de pequeñas moléculas, en procesos de separación y purificación de macromoléculas (Reuhs, 2017).

1.4.1. Descripción del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Dentro de los componentes del equipo de HPLC se encuentran: fase móvil, bomba, inyector, columna, detector y software de registro (Figura 3) (Valls, 2004). Los diferentes análisis en el equipo cromatográfico pueden realizarse en unos pocos minutos, la muestra a determinar pasa través de una fase estacionaria empaquetada en columnas de acero inoxidable por las que circula la fase móvil con una determinada presión y flujo (Romero, Escalada, Bregliani & Pajares, 2016).

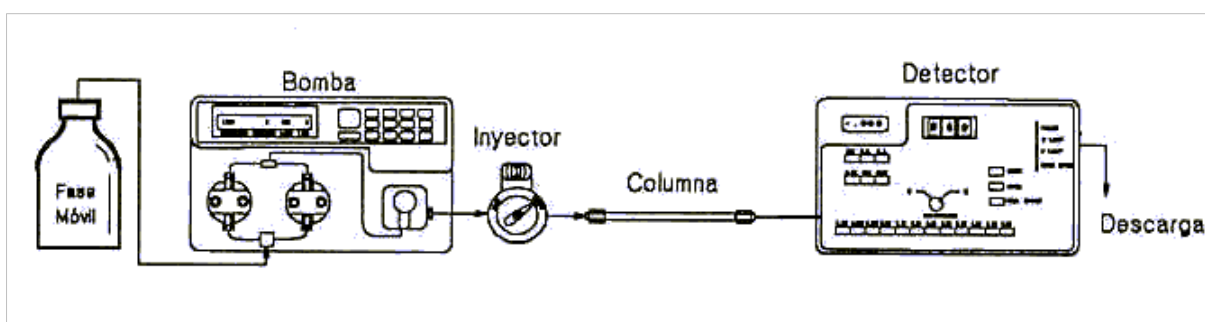


Figura 3. Componentes del equipo de cromatográfico HPLC.

Fuente: Valls, 2004.

Elaboración: Autora, 2019.

El proceso de separación y el tiempo de retención estarán determinados por la combinación empleada entre fase estacionaria y fase móvil, cuando el eluato sale de la columna pasa por un detector, donde desarrollará una señal directamente proporcional a la cantidad presente en la muestra (Romero et al., 2016; Valls, 2004).

1.4.2. Detectores.

Los detectores permiten ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica (Aranda, 2002). Según Romero et al (2016),

su funcionamiento se basa principalmente en las propiedades espectrofotométricas, electroquímicas, físicas o estructurales de los compuestos a determinar.

1.4.2.1. Detectores generales.

Estos tipos de detectores miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura (Aranda, 2002; Plou & Torres, 2014), por ejemplo el detector de índice de refracción, éste es poco sensible y se lo utiliza para la determinación de carbohidratos y lípidos (Romero et al., 2016).

1.4.2.2. Detectores selectivos.

Son sensibles a alguna propiedad específica del soluto (Aranda, 2002). Dentro de estos tipos de detectores se encuentran el de fluorescencia, electroquímico y el UV/Visible, siendo este último el más empleado debido a que posee buena sensibilidad y permite emplear gradiente de solventes (Romero et al., 2016; Aranda, 2002).

1.4.3. Espectrometría de masas.

Es una técnica analítica basada en el diferente comportamiento de iones producidos a partir de los compuestos analizados en una muestra, de esta manera se determina la relación masa-carga (m/z) y en algunos casos la información estructural directa (Gallegos, 2009; Romero, Fernández, Plaza, Garrido & Martínez, 2007).

Cuando la espectrometría de masas se combina con una técnica separativa, se puede proceder al análisis de mezclas, cuyos componentes son separados en una primera etapa por la técnica cromatográfica seleccionada (Gutiérrez & Droguet, 2002). Por medio de una interfase los componentes de esa mezcla, ya separados, son introducidos en el espectrómetro de masas en donde se procede a la ionización de la muestra mediante impacto electrónico (Payá, 2006).

La espectrometría de masas presenta gran sensibilidad al detectar concentraciones de orden de $\text{ng}/\mu\text{l}$ y permite la identificación de diversos compuestos, proporcionando un espectro característico para cada molécula (Pomilio, Bernatené & Vitale, 2011).

1.5. Validación de métodos analíticos

Consiste en certificar que el método es exacto, reproducible y consistente dentro de un rango de interés, en el cual se va a determinar el analito. Una vez desarrollada y optimizada una metodología por HPLC, debe ser validada, con lo cual se confirma que los resultados emitidos son confiables y seguros (Valls, 2004), por esta razón es importante evaluar los siguientes parámetros:

1.5.2. Linealidad.

Es la capacidad de un método analítico de obtener un resultado directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra (Shama, Vallejo, García & Barbas, 2014), se utiliza como criterio de linealidad un coeficiente de correlación (r^2), del 0,995 (Burneo, 2012).

1.5.3. Límite de detección (LOD).

De acuerdo a Shama et al (2014), es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto. Dosal y Villanueva (2008), especifican que uno de los criterios aceptables, es determinar la concentración medida del promedio de los blancos (m) + 3s. Para fines de validación se considera que deben hacerse 10 lecturas de blancos independientes. El valor de 3s corresponde a 3 veces la desviación estándar de la medición de estos blancos, de esta manera se emplea la siguiente ecuación.

$$\text{LOD} = m + 3s$$

1.5.4. Límite de cuantificación (LOQ).

Según Burneo (2012) es la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Se considera como la concentración de analito que corresponde al valor del promedio del blanco más 5 veces la desviación estándar del mismo (Dosal & Villanueva, 2008), empleando así la siguiente ecuación:

$$\text{LOQ} = m + 5s$$

1.5.5. Exactitud.

Corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero. Este parámetro determina las desviaciones del método analítico de uno "ideal". Las variaciones pueden deberse a empleo del método inadecuado, interferencias en la extracción, alteración del analito durante su análisis, etc. (Valls, 2004).

1.5.6. Precisión.

Es la dispersión de las medidas alrededor de su valor promedio. Se expresa matemáticamente como desviación estándar o coeficiente de variación con el fin de evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida, debido a errores sistemáticos o aleatorios que producen la dispersión alrededor del promedio (Valls, 2004).

1.5.7. Repetibilidad.

Es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista, utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo; debe existir un coeficiente de variación menor al 10% (Eurachem, 2016).

1.5.8. Reproducibilidad.

Es una medida de la variabilidad de resultados de distintos operarios, analizando el mismo elemento en un mismo equipo (Taipe, 2014). Llamaza, Meza y Botero (2007) establecen que, para que el método sea apropiado el coeficiente de variación debe ser menor al 15%.

1.5.9. Recuperación.

Es la concentración medida respecto a la cantidad conocida añadida a la matriz, este parámetro permite observar el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original (Condolo, 2018). La ICH sugiere un rango aceptable de 80 a 120% y es necesario que la valoración se la realice por triplicado (ICH, 2005).

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Esquema metodológico empleado

La metodología de esta investigación se desarrolló en dos partes: obtención del extracto de acetato de etilo de la especie *L. mutica* (Figura 4) y validación del método analítico (Figura 5).

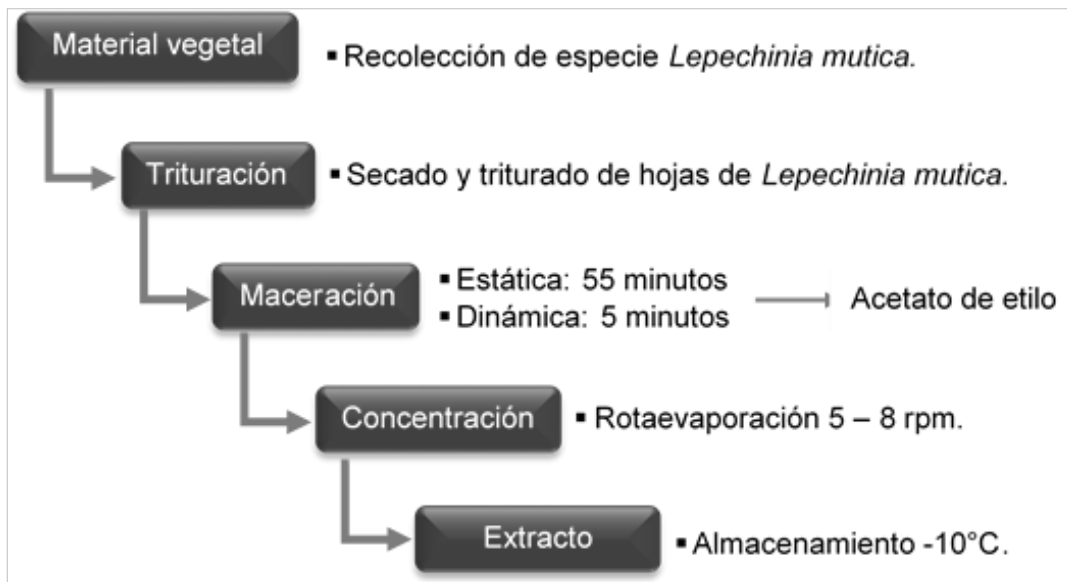


Figura 4. Esquema de obtención de extracto acético de la especie *Lepechinia mutica*.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

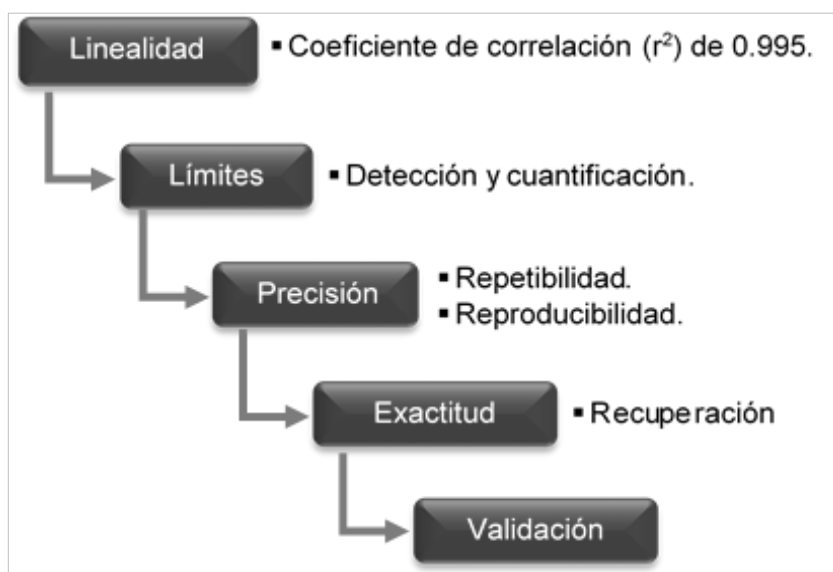


Figura 5. Esquema de validación del método analítico.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

2.2. Recolección del material vegetal

La especie *Lepechinia mutica* Benth (voucher: PPN-la-005) fue recolectada en la provincia de Loja bajo autorización MAE-DNB-CM-2016-0048, en una zona cercana al cerro Villonaco (coordenadas geográficas de 4°00'03.57"S y 79°16'33.16" O) en el mes de junio del 2018 (Figura 6). Se seleccionó las hojas y se eliminó tallos e impurezas.



Figura 6. Zona de recolección del material vegetal.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

2.3. Secado y triturado del material vegetal

Las hojas de *L. mutica* fueron almacenadas en la cámara de secado a 30°C por tres días. Se realizó la trituración manual de las hojas secas y se procedió a pesar 400 g del material vegetal.

2.4. Maceración

Se colocó los 400 g de material vegetal en un recipiente de vidrio con aproximadamente 3,5 litros de acetato de etilo, se procedió a realizar maceración estática por 55 minutos, seguida de maceración dinámica por 5 minutos; dicho proceso se ejecutó por tres veces consecutivas. Una vez finalizada la maceración se filtró al vacío en un matraz kitasato, utilizando papel filtro y un embudo de Büchner. Se concentró mediante rotaevaporación a 35°C, de 5 a 8 rpm, hasta obtener el extracto totalmente seco. El extracto fue almacenado a - 10°C.



Figura 7. Maceración y filtración del material vegetal.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

2.5. Optimización de condiciones cromatográficas

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución Dionex Ultimate 3000 está acoplado a un espectrómetro de masas marca Bruker, se utilizó una columna C18 de acero inoxidable

marca Agilent con tamaño de partícula de 5 µm. Las condiciones cromatográficas optimizadas se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas.

Columna	Eclipse plus C18 (2,1 x 150 mm) (Tamaño de partícula: 5 µm)
Detector	Diodos a 280 nm
Espectrómetro de masas	Peso molecular: 331 g/mol
Fase móvil	Solvente A (Acetonitrilo 30% / Agua 70% / 0,1% de ácido fórmico). Solvente B (Acetonitrilo 60% / Agua 40% / 0,1% de ácido fórmico).
Flujo	0,5 ml/min
Modo	Gradiente: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 0 – 4 minutos: 100% A / 0% B ▪ 4 – 17 minutos: 50% A / 50% B ▪ 17 – 20 minutos: 0% A / 100% B ▪ 20 – 25 minutos: 100% A / 0% B
Volumen de inyección	5 µl

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

2.6. Validación del método analítico

2.6.1. Preparación de soluciones patrón y muestras.

2.6.1.1. Solución patrón.

Se pesó 10 mg de carnosol y se aforó con metanol grado HPLC en un balón de 10 ml, de esta manera se obtuvo una concentración final de 1000 ng/µl. Para evaluar el parámetro de recuperación también se preparó una solución patrón a una concentración de 500 ng/µl.

2.6.1.2. Preparación de muestra a partir del extracto de *L. mutica*.

Se pesó 5 mg de extracto y se aforó con metanol grado HPLC en un balón de 10 ml, obteniendo una concentración de 500 ng/µl.

2.6.2. Linealidad.

Se construyó una curva de calibración promedio de los 10 días en los que se inyectó en el equipo de HPLC-MS, 5 diferentes concentraciones preparadas a partir de la solución patrón.

Con los resultados obtenidos de cada día se realizó un gráfico de dispersión lineal, comparando el área del pico frente a la concentración respectiva.

2.6.2.1. Preparación de estándares.

A partir de la solución patrón, se preparó 5 viales de 1,5 ml a diferentes concentraciones (Ver Anexo II).

- 100 ng/μl: Se tomó 150 μl de solución patrón y se añadió 1350 μl de metanol grado HPLC.
- 200 ng/μl: Se tomó 300 μl de solución patrón y se añadió 1200 μl de metanol grado HPLC.
- 400 ng/μl: Se tomó 600 μl de solución patrón y se añadió 900 μl de metanol grado HPLC.
- 600 ng/μl: Se tomó 900 μl de solución patrón y se añadió 600 μl de metanol grado HPLC.
- 800 ng/μl: Se tomó 1200 μl de solución patrón y se añadió 300 μl de metanol grado HPLC.

2.6.3. Límites de cuantificación (LOQ).

Para esta determinación se utilizó muestras de blanco (metanol grado HPLC) que se inyectaron en el equipo de HPLC-MS, por triplicado durante 10 días y se aplicó la siguiente ecuación:

$$LOQ = m + 5 DE$$

Donde: m = media

DE = Desviación estándar de los resultados analizados de los blancos inyectados.

2.6.4. Límites de detección (LOD).

De igual manera se utilizaron muestras de blanco (metanol grado HPLC) que se inyectaron por triplicado durante 10 días y se aplicó la siguiente ecuación:

$$LOD = m + 3 DE$$

Donde: m = media

DE = Desviación estándar de los resultados analizados de los blancos inyectados.

2.6.5. Exactitud.

La exactitud se determinó en base al análisis de recuperación. Se pesó 5 mg de extracto y se añadió 500 μl de solución patrón de 500 ng/μl. Luego se aforó con 4500 μl de metanol. La determinación se realizó por 10 días consecutivos mediante la inyección en el equipo HPLC-MS.

2.6.6. Precisión.

La precisión se determinó en base al análisis de repetibilidad y recuperación.

El parámetro de repetibilidad fue realizado por el analista (Corina Loja), bajo la misma metodología e igual equipo de cromatografía; se inyectó durante 10 días la solución del extracto preparado a 500 ng/μl.

El parámetro de reproducibilidad fue realizado por dos analistas, bajo la misma metodología e igual equipo de cromatografía; se inyectó durante 10 días la solución del extracto preparado a 500 ng/μl. Analista 1: Corina Loja. Analista 2: Mgtr. Natalí Solano.

2.6.7. Análisis estadístico.

Todos los parámetros fueron evaluados en una hoja de cálculo de Excel. Para el parámetro de linealidad, se elaboró una curva de área vs concentración con el fin de determinar el coeficiente de correlación, el cual debe ser mayor a 0,995.

Para los datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad, se realizó un test de análisis de varianza (ANOVA) para determinar el coeficiente de variación y el valor de F, aplicando las siguientes ecuaciones:

SDC_B = Suma de cuadrados entre grupos.

$$SDC_B = \sum p(X_i - \bar{X})^2$$

DCM_w = Promedio de cuadrados entre grupos.

$$DCM_w = \frac{SDC_B}{n}$$

SDC_w = Suma de cuadrados dentro de grupos.

$$SDC_w = \sum (X_{ij} - \bar{X})^2$$

DCM_w = Promedio de cuadrados dentro de grupos.

$$DCM_w = \frac{SDC_w}{n}$$

Sr = Desviación estándar de repetibilidad.

$$Sr = \sqrt{DCM_w}$$

SL = Precisión intermedia.

$$SL = \frac{DCM_B - DCM_w}{p}$$

SR = Desviación estándar de reproducibilidad.

$$SR = \sqrt{Sr^2 + SL^2}$$

2.7. Cuantificación de carnosol

Se calculó la concentración (C_i) en el extracto a través de la ecuación de la recta (Anexo VI) y se determinó el porcentaje de carnosol a través de la siguiente ecuación:

$$\%Carnosol = \frac{C_i * Volumen\ de\ aforo}{Peso\ extracto} * 100$$

CAPÍTULO III
RESULTADOS

3.1. Extracto de *Lepechinia mutica*

El extracto de la especie *Lepechinia mutica* se obtuvo a través de dos tipos de maceración: estática y dinámica. Se eligió como solvente acetato de etilo, con el fin de adquirir un concentrado que presente el compuesto de interés como el carnosol.



Figura 8. Extracto total de especie *Lepechinia mutica*.
Fuente: Autora, 2019.
Elaboración: Autora, 2019.

El tiempo empleado fue de 55 minutos para maceración estática y 5 minutos de maceración dinámica, Padilla (2018) recomienda realizar este proceso por tres veces consecutivas utilizando el solvente adecuado, razón por la que se define que el extracto obtenido se encuentra en óptimas condiciones para emplearlo en el ensayo.

El rendimiento calculado se especifica en el Anexo II, este fue de 12,5% (Tabla 3), el valor se aproxima al obtenido por Padilla (2018), que fue de 15,34%, en este caso se realizó el mismo proceso pero con diferente solvente. Es necesario definir que el rendimiento de extracción depende del tiempo empleado, tipo de solvente y de condiciones ambientales en las que se realizó la recolección y maceración.

Tabla 3. Rendimiento del extracto obtenido de especie *Lepechinia mutica*.

Peso extracto obtenido	Peso de materia seca	Rendimiento
50 g	400 g	12,5 %

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

3.2. Especificidad del método

A partir de la optimización de las condiciones cromatográficas, se determinó el tiempo de retención de 15,9 min para el carnosol, el cromatograma obtenido se observa en la figura 9.

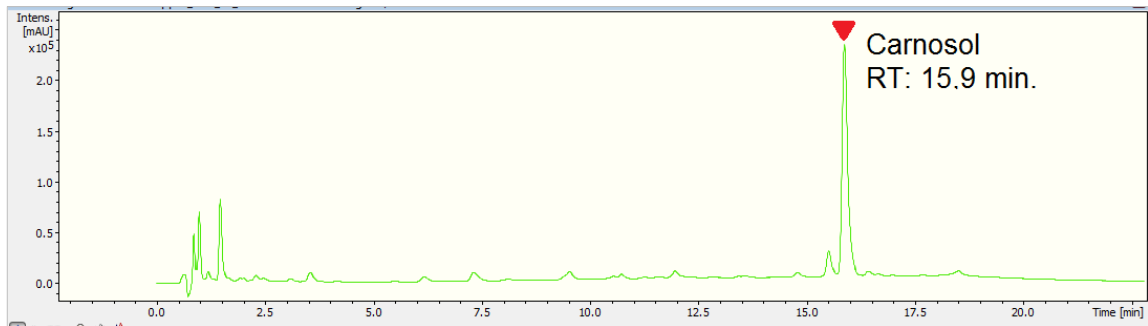


Figura 9. Cromatograma de carnosol.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

El peso molecular de carnosol según PubChem Compound Database es 330,42 g/mol, en la figura 10 se visualiza el espectro obtenido, el pico del ion molecular correspondiente a carnosol presenta un peso molecular de 331,16 (M+H⁺).

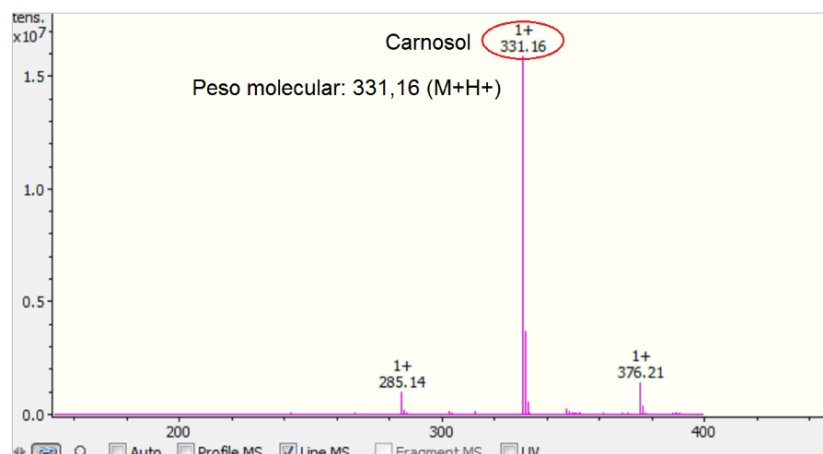


Figura 10. Espectro de carnosol.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

El método aplicado en el equipo de cromatografía permitió determinar el tiempo de retención específico para el carnosol, esto va a depender de la fase móvil empleada y el tipo de columna cromatográfica, Riquelme (2011), en su metodología aplica agua acidulada con ácido fosfórico, lo que conllevó a obtener un tiempo de retención de 1,8 minutos, en comparación con el tiempo obtenido en nuestro análisis que fue de 15,9 minutos.

3.3. Validación del método

La validación de métodos analíticos se encuentra ligado a actividades enfocadas en asegurar la calidad de los laboratorios, demostrando que los resultados son seguros y confiables, para ello se cumplió con los requisitos de desempeño analítico, como exactitud, precisión, determinación de límite de detección y cuantificación, linealidad, veracidad y rango de trabajo. Los resultados se detallan a continuación:

3.3.1. Rango de trabajo.

Se estableció un intervalo desde 100 a 800 ng/μl.

3.3.2. Linealidad.

Los criterios de aceptación planteados para la linealidad del método son los siguientes:

- Coeficiente de correlación (r^2): mayor a 0,995
- Pendiente: distinta de cero
- Intercepto: distinto de cero.

La linealidad del método se analizó mediante la realización de una curva de calibración con muestras estándar con las siguientes concentraciones: 100, 200, 400, 600 y 800 ng/μl.

Tabla 4. Datos para la curva de calibración de carnosol.

Concentración (ng/μl)	Área del pico (mUA*s)
100	141414,2594
200	313604,9938
400	667423,8001
600	978935,8063
800	1311991,369

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Con los datos obtenidos (Tabla 4) se determinó la ecuación de la curva y el coeficiente de correlación (Ver Anexo III), la guía Eurachem, (Morrillas, Barwick, Ellison, Engman, & Magnusson, 2016) establece que dicho coeficiente debe ser mayor a 0,995; de esta manera, se comprueba que la curva cumple con los requisitos mencionados y que, de acuerdo a López (2009), se podrá obtener resultados de prueba, que sean directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

- **Ecuación:** $1668,2x - 17972$
- **Coeficiente de correlación:** 0,9995

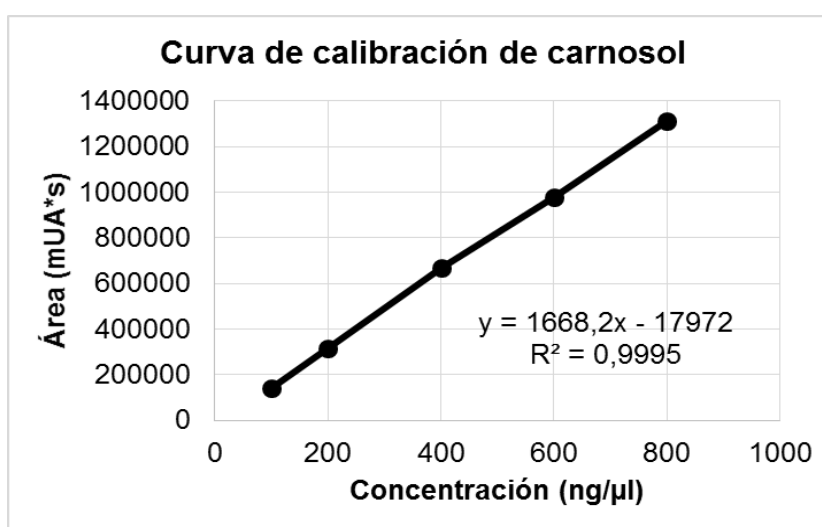


Figura 11. Linealidad del método para determinación de carnosol.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

3.3.3. Límite de detección y de cuantificación.

Mediante la lectura de 10 blancos promedio se determinó el límite de detección y de cuantificación. Los cálculos empleados se pueden visualizar en el Anexo IV y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

El límite de detección obtenido fue de 278 ng/μl, este valor permitió especificar la concentración mínima que es estadísticamente diferente al blanco y que puede ser detectada en el equipo de cromatografía (Quino, Ramos & Guisbert, 2007). El límite de cuantificación calculado fue de 348 ng/μl, de esta manera, se obtuvo la concentración más baja que podrá ser determinada con precisión, así lo especifica (Rodríguez, Pellerano, Romero, Acevedo & Vásquez, 2012).

Tabla 5. Resultados obtenidos de la lectura de blancos.

N° de Blanco	Área del pico (mUA*s)	Resultado (mg/ml)	Resultado (ng/μl)
1	2844,0493	0,03004	30,0421
2	5648,3403	0,00243	2,42635
3	7728,1099	0,00163	1,63443
4	8528,1641	0,00274	2,73568
5	13333,6875	0,00207	2,06669
6	15248,6963	0,00164	1,63635
7	19899,1211	0,00122	1,21614
8	32225,2578	0,00594	5,94348
9	2079,4412	0,01803	18,0297
10	2499,6223	0,01841	18,4075
LOD		0,03872	38,7174
LOQ		0,05892	58,9197

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

3.3.4. Precisión.

3.3.4.1. Repetibilidad y Reproducibilidad.

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados obtenidos bajo una misma metodología, la guía Eurachem emite criterios de aceptación de un coeficiente de variación menor a 10% para repetibilidad y menor a 15% para reproducibilidad, para ello se debe realizar un test ANOVA (Ver Anexo V) en el cual se analice dicho coeficiente y el valor de F.

Tabla 6. Repetibilidad del método.

Analista	Coeficiente de variación (%)	Condición	
Corina Loja	0,97%	Menor a 10%	Cumple

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

El proceso para la determinación de repetibilidad se realizó bajo las mismas condiciones metodológicas por el mismo analista, obteniendo un porcentaje de 0,97% (tabla 6), este valor es relativamente bajo, ya que no existe mayor variación entre los resultados.

Tabla 7. Reproducibilidad del método.

Analista	Coefficiente de variación (%)	Condición	
Corina Loja	0,97%	Menor a 15%	Cumple
Mgtr. Natalí Solano	0,94%	Menor a 15%	Cumple

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

El análisis de reproducibilidad se efectuó bajo las mismas condiciones metodológicas pero con diferente analista, determinando un porcentaje de 0,97% y 0,94% (tabla 7), González y Falcón (2015), manifiestan que este ensayo permite especificar la influencia de los analistas y del equipo sobre los resultados obtenidos, esto conlleva a definir, que el método analítico que se empleó es preciso.

Tabla 8. Valor de F calculado.

Valor F crítico	Valor F calculado	Conclusión
5,1921	1,4063	No existe diferencia significativa

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Debido a que el porcentaje de repetibilidad y reproducibilidad fue menor a 10 y 15% respectivamente y el F crítico fue mayor al F calculado, se demuestra que el proceso analítico cumple con las condiciones establecidas, por lo tanto, se ha determinado que no hay diferencia significativa y de esta manera se asegura la calidad del método.

3.3.5. Exactitud.

3.3.5.1. Recuperación.

En base al porcentaje de recuperación (Ver Anexo VI) se determinó la exactitud. Se pesó 5 mg de extracto y se añadió 500 µl de solución patrón de 500 ng/µl. Luego se aforó con 4500 µl de metanol. Se realizó la lectura de las muestras enriquecidas y se calculó el porcentaje de recuperación para cada resultado:

Tabla 9. Porcentaje de recuperación.

Analista 1 Corina Loja	Analista 2 Mgtr. Natalí Solano
95%	93%
105%	107%
108%	100%
101%	102%
99%	99%
110%	98%
102%	103%
115%	112%
102%	101%
104%	100%

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

3.3.5.2. Gráfica control.

La gráfica realizada muestra una distribución normal con un porcentaje de 93% a 112%, estos valores se encuentran dentro del rango aceptable estipulado por la ICH (2005) de 80% a 120%.

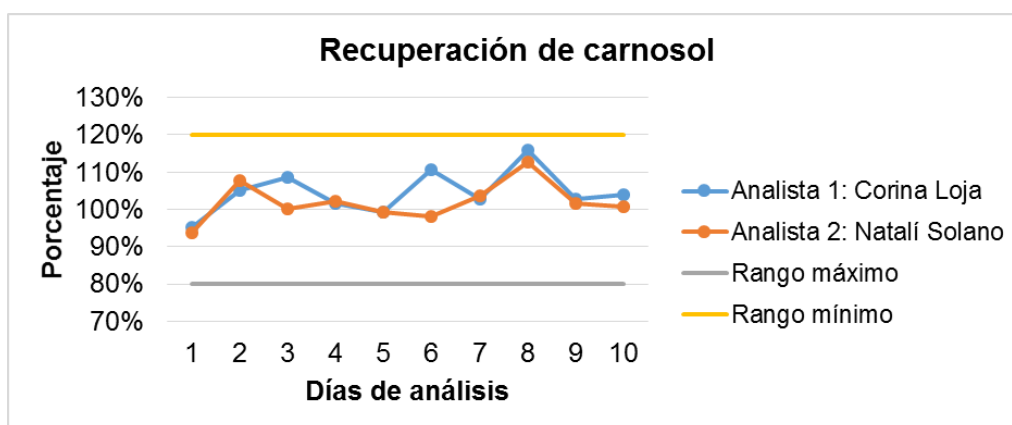


Figura 12. Gráfica control del carnosol.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

El proceso analítico realizado cumple con todos los parámetros de desempeño analítico, en la tabla 11 se detalla cada resultado obtenido. En base al método cromatográfico cabe destacar que el carnosol es una molécula de tipo liposoluble, razón por la cual, Riquelme (2011), recomienda el uso de metanol, acetonitrilo y agua acidificada; la fase móvil que se utilizó en el presente ensayo consistió de acetonitrilo y agua con 0,1% de ácido fórmico, y de esta manera se logró realizar un análisis correcto.

La solución stock se preparó de manera similar a la solución preparada por Zhang et al (2012) obteniendo una concentración de 1000 ng/μl, en este caso se realiza el análisis a partir del extracto obtenido de la especie *Rosmarinus officinalis*, en este estudio se llevó a cabo la determinación a partir de extracto de acetato de etilo de la especie *Lepechinia mutica*, comparando la curva de calibración realizada por Zhang et al (2012) se observa que el coeficiente de correlación es de 0,9999 mientras que, el coeficiente de correlación de esta investigación es de 0,9995.

Tabla 10. Síntesis de los resultados obtenidos en el proceso de validación.

Parámetro		Requisito	Resultado
Linealidad		$R^2 > 0,995$	0,9995
Rango de trabajo		100 – 800 ng/μl	100 – 800 ng/μl
Límite de detección		$LOD = m + 3 DE$	278 ng/μl
Límite de cuantificación		$LOQ = m + 5 DE$	348 ng/μl
Precisión	Repetibilidad	%CV < 10%	0,97% < 10%
	Reproducibilidad	%CV < 15%	0,97% < 15% 0,94% < 15%
Exactitud	Recuperación	80 – 120%	93 – 112%

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

3.4. Cuantificación de carnosol

La concentración de carnosol presente en el extracto de la especie *Lepechinia mutica* fue de 14,3783 ng/μl, lo que equivale a un porcentaje de 2,87% (tabla 12); Bauer et al (2012), especifica que la especie *Salvia officinalis* contiene gran cantidad de carnosol y en el proceso de extracción con acetato de etilo obtienen una concentración de carnosol de 4,3%; Hammudi (2015), obtiene un porcentaje de 0,98% en hojas de *Rosmarinus officinalis*, mientras que Wellwood y Cole (2004), obtiene valores que varían de 1,06% a 3,51%.

Tabla 11. Cuantificación de carnosol.

Concentración inicial (extracto diluido)		Concentración final (extracto seco)
14,3783 ng/μl	0,0143 mg/ml	2,87%

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto de acetato de etilo de la especie *Lepechinia mutica* con un rendimiento del 12,5%.
- Se optimizaron las condiciones cromatográficas con el fin de desarrollar un método analítico que permita cuantificar la presencia de carnosol en el extracto de acetato de etilo del material vegetal.
- El método analítico fue validado a través de la evaluación de parámetros como linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud.
- La determinación de Repetibilidad y Reproducibilidad mediante análisis estadístico ANOVA permitió asegurar que el resultado del coeficiente de variación sea menor a 10 y 15%.
- Se aseguró la calidad del método a través de la realización de una gráfica control que presentó una distribución normal para el rango aceptable de 80 a 120%.
- De acuerdo a la guía Eurachem se logró demostrar la linealidad del método ya que se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0,995.
- Debido a que cada parámetro evaluado cumple con los criterios de aceptación y con las normas internacionales de validación analítica establecidas, se deduce que el método es fiable y puede ser aplicado para investigaciones posteriores.

RECOMENDACIONES

- El material de vidrio a emplear deben estar calibrado, limpio y totalmente seco.
- Utilizar barreras de protección primaria como guantes, mandil y mascarilla para la manipulación de diferentes reactivos que son inflamables y corrosivos.
- Las condiciones cromatográficas así como el material, equipo, reactivos deben ser los mismos para todo el método analítico.
- Diseñar un plan de validación, en el que se especifique todas las técnicas a emplear así como los criterios de aceptación de cada parámetro para establecer la validación.
- Revisar periódicamente el correcto funcionamiento del equipo, a través de la ventana de control, asegurando que la lámpara UV esté encendida.
- Todos los reactivos que se empleen deben ser grado HPLC, esto con el fin de asegurar el correcto funcionamiento del equipo y de la columna evitando contaminar las muestras a analizar.

BIBLIOGRAFIA

- Aranda, J. (2002). *Desarrollo de un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para análisis de aminoácidos en ingredientes utilizados en la alimentación animal*. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, México).
- Balslev, H., De la Torre, L., Navarrete, H. & Macía, M. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles en Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA-Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Barros, K., Jaramillo, C., San Martín, D. & D'Armas, H. (2017) Estudio de la calidad bacteriológica de doce plantas medicinales de uso común en Ecuador. *FACSalud-UNEMI*, 1(1), 12-17.
- Bauer, J., Kuehnl, S., Rollinger, J. M., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H. & Koeberle, A. (2012). Carnosol and Carnosic Acids from *Salvia officinalis* Inhibit Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(1), 169-176.
- Bermúdez, A., Oliveira, M. & Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453-459.
- Briones, J. (2017). *Diseño y funcionalidad en sistemas in vivo de nanocápsulas líquidas de aceite de romero (Rosmarinus officinalis)*. (Tesis de maestría, Universidad Veracruzana, México).
- Burneo, M. (2012). *Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de Ascaridol en el extracto hexánico de Chenopodium ambrosioides (Paico) mediante cromatografía de gases – FID*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica Particular de Loja).
- Castillo, L. (2016). *Validación del método analítico por HPLC para la disolución de tabletas de glibenclamida 5mg en medio de disolución con pH 7,5*. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Cires, E. (2004). *Manual para la recolección de plantas y su herborización*. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas Área de Botánica. Universidad de Oviedo, España.
- Condolo, P. (2018). *Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico, para la cuantificación de delta y gamma tocotrienol presentes en las semillas de Bixa Orellana de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, usando cromatografía de gases*

acoplado a espectrometría de masas. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica Particular de Loja).

De la Cruz, A. (2014). *Acción antimicrobiana de extracto etanólico de Gnaphalium vira vira (Wira Wira)*. (Tesis de maestría, Universidad Nacional del Antiplano – Puno, Perú).

Dosal, M. & Villanueva, M. (2008). *Introducción a la metrología química. Curvas de calibración en los métodos analíticos*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Drew, B. & Sytsma, K. (2013). The South American radiation of *Lepechinia* (Lamiaceae): phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(1), 171-190.

Esteves, P., Kuster, R., Barbi, N. & Menezes, F. (2010). Chemical Composition and Cytotoxic Activity of *Lepechinia speciosa* (St. Hill) Epling. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(1), 38-44.

Florián, A. (2016). *Elaboración y análisis sensorial de tres perfumes que contienen extractos de plantas de producción nacional*. (Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala, México).

Gallegos, J. (2009). Aplicación de la Espectrometría de Masas en Proteómica para la Búsqueda de Biomarcadores (Application of Mass Spectrometry for Biomarkers Searching). *Mensaje Bioquímico*, 23(1), 131-146.

González, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*. (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Colombia).

González, G. & Falcón, C. (2015). Procedimiento para el análisis de repetibilidad y reproducibilidad en procesos de manufactura. *Revista Cubana de Ingeniería*, 6(3), 53-59.

Gutiérrez, M. & Droguet, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Instituto de Investigación Textil y Cooperación Industrial*, (122), 35-41.

Hammudi, M. (2015). Fast High Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Method for Determination of Phenolic Antioxidants in Fresh Rosemary Leaves. *Journal of Natural Sciences Research*, 5(17). 89-92.

- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. (2005). *Validation Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*.
- Johnson, J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters*, 305(1), 1-7.
- Kashyap, D., Kumar, G., Sharma, A., Sak, K., Tuli, H. & Mukherjee, T. (2016). Mechanistic insight into carnosol-mediated pharmacological effects: Recent trends and advancements. *Life Sciences*, 169(1), 27-36.
- Krieger-Liszky, A., Loussouarn, M., Svilar, L., Bily, A. Birtić, S. & Havaux, M. (2017). Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms. *Plant Physiology*, 175(3), 1381-1394.
- León, S., Valencia, R., Pitman, N. & Endara, C. (2011). *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Llamosa, L., Meza, L. & Botero, M. (2007). Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025. *Scientia Et Technica*, 13(35), 455-460.
- López, L. (2009). *Determinación de parámetros de desempeño en métodos analíticos espectrofotométricos específicos para cuantificar fosforo y potasio en suelos utilizados para cultivo de café*. (Tesis de pregrado, Universidad del Salvador).
- Montúfar, R. & Pitman, N. (2004). *Lepechinia mutica*. *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Morrillas, P., Barwick, V., Ellison, S., Engman, J. & Magnusson, B. (2016). Guía Eurachem: *La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*.
- Muñoz, W., Chávez, W., Pabón, L., Rendón, M., Patricia, M., Otálvaro, A. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanedia lineatifolia*). *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 46(1). 38-46.
- Padilla, J. (2018). *Aislamiento e identificación del diterpeno carnosol a partir de las especies vegetales Lepechinia mutica Benth y Rosmarinus officinalis Linneo*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador).

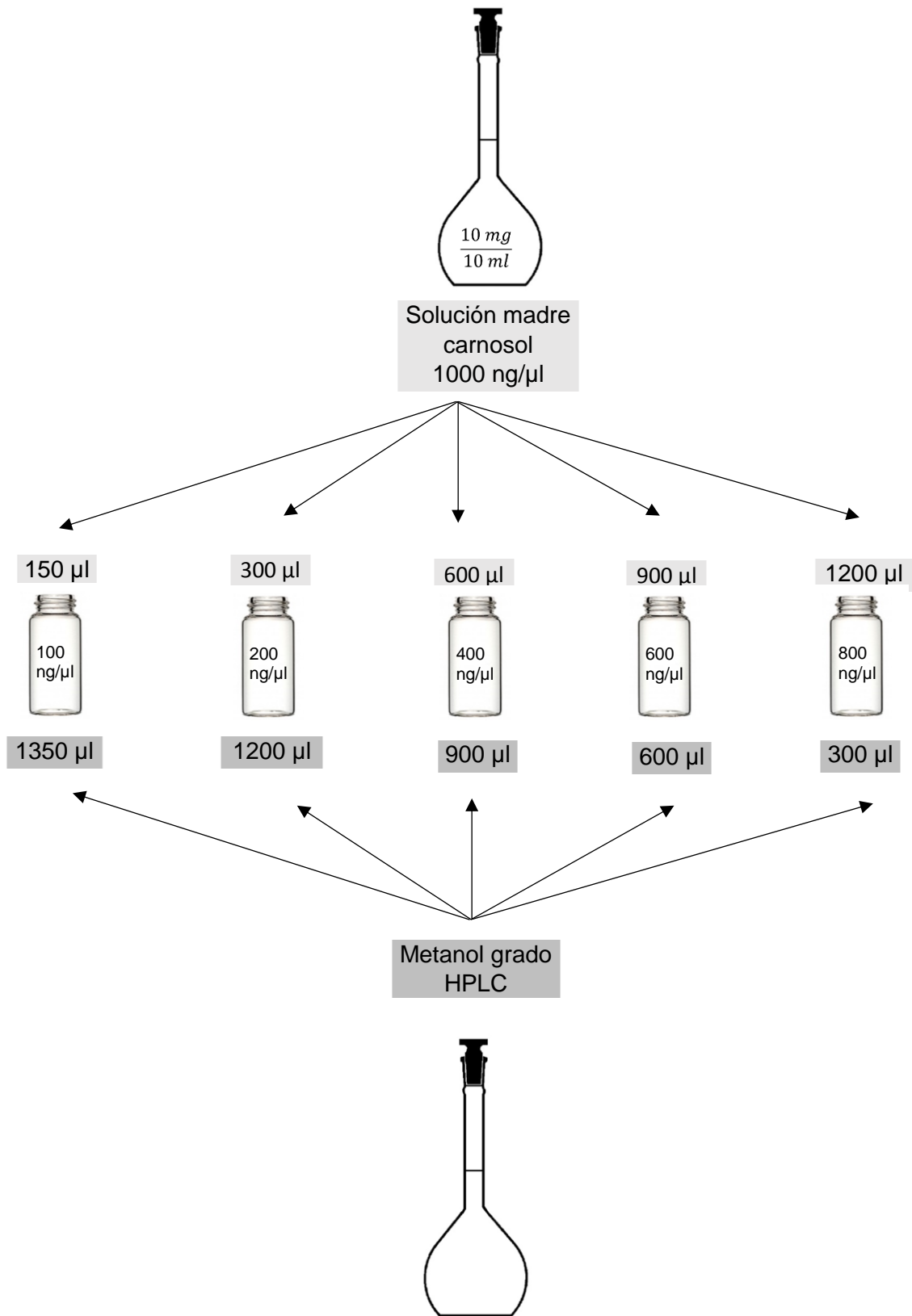
- Park, K., Kundu, J., Chae, I., Yu, M., Kumar, J. & Chun, K. (2014). Carnosol induces apoptosis through generation of ROS and inactivation of STAT3 signaling in human colon cancer HCT116 cells. *International Journal of Oncology*, 44(4), 1309-1315.
- Payá, A. (2006). *Fundamentos y funciones de la Espectrometría de masas*. Universidad de Valencia, España.
- Plou, F. & Torres, P. (2011). *Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)*. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. Madrid, España,
- Pomilio, A., Bernatené, E. & Vitale, A. (2011). Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 45(1), 47-79.
- Quino, I., Ramos, O. & Guisbert, E. (2007). Determinación del límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LCI) en elementos traza de agua subterránea. *Revista Bolivariana de Química*, 24(1), 53-57.
- Ramírez, J., Gilardoni, G., Jácome, M., Montesinos, J., Rodolfib, M., Guglielminettib, M., Cagliero, C., Bicchi, C. & Vidari, G. (2017). Chemical composition, enantiomeric analysis, AEDA sensorial evaluation and antifungal activity of the essential oil from the Ecuadorian plant *Lepechinia mutica* Benth (Lamiaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 14(2), e1700292.
- Ramírez, J., Gilardoni, G., Ramón, E., Tosi, S., Picco, A., Bicchi, C. & Vidari, G. (2018). Phytochemical Study of the Ecuadorian Species *Lepechinia mutica* (Benth.) Epling and High Antifungal Activity of Carnosol against *Pyricularia oryzae*. *Pharmaceuticals*, 11(33), 1-14.
- Ramírez, J., Suárez, A., Bec, N., Armijos, C., Gilardoni, G., Larroque, C. & Vidari, G. (2018). Carnosol from *Lepechinia mutica* and tiliroside from *Vallea stipularis*: Two promising inhibitors of BuChE. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, (28). 559–563.
- Reuhs B. (2017) *High-Performance Liquid Chromatography*. In: Nielsen S. (eds) Food Analysis. Food Science Text Series. Springer, Cham.
- Riquelme, A. (2011). *Introducción de Nuevas Tecnologías y Screening de Material Genético para mejorar la Competitividad y Aumentar la Oferta Exportable de Orégano y Romero*. Corporación de Fomento de la Producción. Chile.

- Rodríguez, S., Pellerano, R., Romero, C., Acevedo, H. & Vásquez, F. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Revista Tumbaga*, 7(1), 55-71.
- Romero, A., Escalada, J., Bregliani, M. & Pajares, A. (2016). Utilización de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para determinar consumo de sustrato. *Revista de Informes Científicos Técnicos-UNPA*, 8(2), 52-59.
- Romero, R., Fernández, J., Plaza, P., Garrido, A. & Martínez, J. (2007). Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Revista Española de Salud Pública*, 81(5), 461-474.
- Rondón, A. & Ponte, C. (2010). Conocimiento y valoración de las plantas medicinales, aromáticas y culinarias que poseen los estudiantes del IPC. *Aula y ambiente*, 10(19), 13-23.
- Sánchez-González, A. y González L. 2007. *Técnicas de recolecta y herborización de plantas*. En: Contreras, R. A., Goyenechea, I., Cuevas, C. C. & Iturbe, U. (eds.). La Sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Ciencia al Día 5. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 177-193.
- Shama, N., Vallejo, M., García, M. & Barbas, C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*, 1353, 99-105.
- Suárez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F. & Hernández, G. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en Química*, 4(2), 53-62.
- Tabio, D., Díaz, Y., Rondón, M., Fernández, E., Piloto, R. (2017). *Extracción de aceites de origen vegetal*. Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”, Cuba.
- Taípe, D. (2014). *Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, zinc y potasio por espectrofotometría en muestras de agua en el Centro de Investigaciones y Control Ambiental*. (Tesis de pregrado, Escuela Politécnica Nacional, Ecuador).
- Valls, J. (2004). *Validación de metodologías de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en alimentos*. (Tesis de postgrado, Universidad Central de Caracas, Venezuela).

- Wang, L. Zhang, Y., Liu, K., Chen, H., Yang, R., Ma, X., Kim, H., Bode, A, Kim, D. & Dong, Z. (2018). Carnosol suppresses patient-derived gastric tumor growth by targeting RSK2. *Oncotarget*, 9(76), 34200-34212.
- Wellwood, C. & Cole, R. (2004). Relevance of Carnosic Acid Concentrations to the Selection of Rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), Accessions for Optimization of Antioxidant Yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6101-6107.
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N. & Jiménez, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Revista Universidad y Salud*, 17(1), 97-111.
- Zhang, Y., Smuts, J., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. & Armstrong, D. (2012). Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9305-9314.

ANEXOS

Anexo I. Diagrama de preparacion de estandares para método analítico.



Anexo II. Cálculo del rendimiento del extracto obtenido de la especie *Lepechinia mutica*.

A partir de la siguiente fórmula se procedió a determinar el rendimiento de extracción:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{g de extracto obtenido}}{\text{g de materia seca}} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{50 \text{ g}}{400 \text{ g}} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = 12,5 \%$$

Anexo III. Determinación de Linealidad

Se construyó una curva de calibración por cada día (Figura 13), con los resultados obtenidos se calculó la media, se realizó un gráfico de dispersión lineal, comparando el área del pico frente a la concentración respectiva, obteniendo los datos que se visualizan en la Tabla 12.

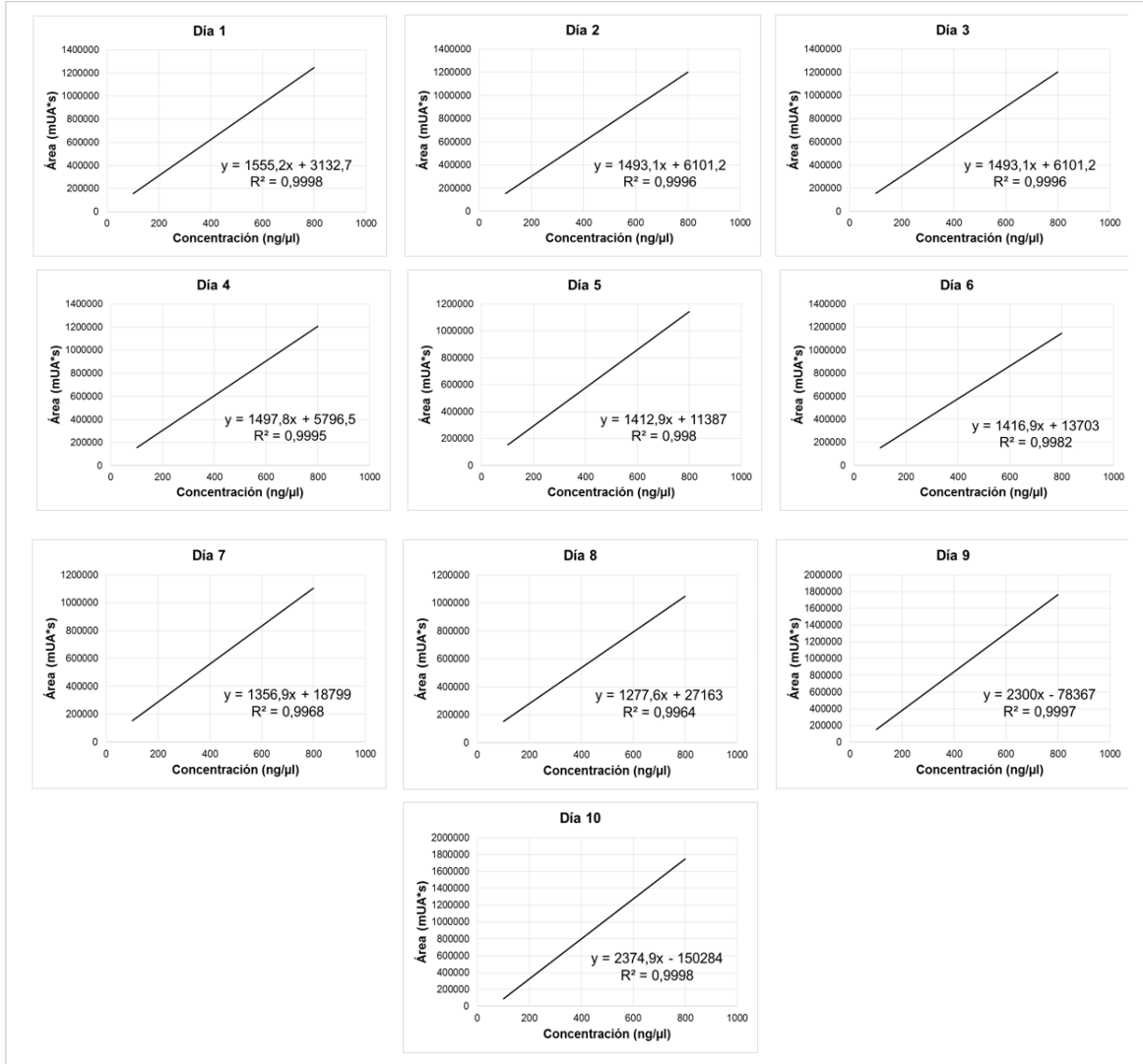


Figura 13. Curvas de calibración realizadas para determinación de linealidad.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Tabla 12. Datos para la determinación de linealidad.

Día	100 ng/μl	200 ng/μl	400 ng/μl	600 ng/μl	800 ng/μl
1	141112,25	391689,875	749484,125	1171575,375	1553619,25
2	156040,5781	311203,1875	630208,3125	944395,0625	1239810,125
3	152621,125	301798,2188	616675,0625	893710,8125	1201106,5
4	149538,2031	302593,3438	621927,1875	899984,875	1200413,875
5	141534,0469	288161,0313	608400	851897,375	1134085,5
6	145200,3281	292067,0625	610704,5625	854096,875	1141949
7	141472,4063	284793,8125	599959,5	817795,75	1099414,125
8	139262,2813	276048,6563	575515,4375	793858,4375	1034130,563
9	149899,0156	372039,625	861515,3759	1296605,375	1758005,125
10	97462,3594	315655,125	799848,4375	1265438,125	1757379,625
Media	141414,2594	313604,9938	667423,8001	978935,8063	1311991,369
Coefficiente de relación	0,9995				

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

La curva de calibración se realizó con la finalidad de determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación (R^2) como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 13. Determinación de pendiente e intercepto de la curva de calibración.

N°	Concentración (ng/μl) X	Área Y	(X*Y)	X ²
1	100	141414,2594	14141425,94	10000
2	200	313604,9938	62720998,75	40000
3	400	667423,8001	266969520	160000
4	600	978935,8063	587361483,8	360000
5	800	1311991,369	1049593095	640000
Total	2100	3413370,228	1980786523	1210000

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Pendiente:

$$m = \frac{n \sum XY - (\sum X * \sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$m = \frac{5 (1980786523) - (2100 * 3413370,228)}{5 (1210000) - (2100)^2}$$

$$m = 1668,204352$$

Intercepto:

$$m = \frac{(\Sigma Y * \Sigma X^2) - (\Sigma X * \Sigma XY)}{n \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$m = \frac{(3413370,228 * 1210000) - (2100 * 1980786523)}{5 (1210000) - (2100)^2}$$

$$m = -17971,7824$$

Tabla 14. Datos para determinar el coeficiente de correlación de carnosol.

N°	X	(X- \bar{x})	(X- \bar{x}) ²	Y	(Y- \bar{y})	(Y- \bar{y}) ²	(X- \bar{x}) (Y- \bar{y})
1	100	-320	102400	141414,2594	-541259,786	2,9296E+11	1,7E+08
2	200	-220	48400	313604,9938	-369069,052	1,3621E+11	8,1E+07
3	400	-20	400	667423,8001	-15250,2456	2,33E+08	305005
4	600	180	32400	978935,8063	296261,7606	8,7771E+10	5,3E+07
5	800	380	144400	1311991,369	629317,3231	3,9604E+11	2,4E+08
Total	2100		328000	3413370,228		9,1322E+11	5,5E+08
Media	420			682674,0456			

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Coeficiente de correlación:

$$r = \frac{\Sigma(X - \bar{x}) * (Y - \bar{y})}{\sqrt{\sqrt{(X - \bar{x})^2 * (Y - \bar{y})^2}}}$$

$$r = \frac{547171027,6}{\sqrt{\sqrt{328000 * 9,1322E+11}}}$$

$$r = 0,9995$$

Tabla 15. Pendientes e interceptos de carnosol.

Parámetro	Resultado
Pendiente mínima	1277,6
Pendiente máxima	2374,9
Intercepto mínimo	-150284
Intercepto máximo	27163
Pendiente	1668,21
Intercepto	-17971,66

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Anexo IV. Datos para determinar límite de detección y cuantificación.

Se aplicó la ecuación respectiva para la determinación de cada límite a partir de la determinación de la media y desviación estándar de los resultados obtenidos.

Tabla 16. Resultados obtenidos de la lectura de blancos.

N° Blanco	Área (mUA*s)	Resultado (mg/ml)
1	2844,0493	0,03004
2	5648,3403	0,00243
3	7728,1099	0,00163
4	8528,1641	0,00274
5	13333,6875	0,00207
6	15248,6963	0,00164
7	19899,1211	0,00122
8	32225,2578	0,00594
9	2079,4412	0,01803
10	2499,6223	0,01841
Media (m)		0,00841
Desviación estándar (DE)		0,0101

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Límite de cuantificación:

$$LOQ = m + 5 DE$$

$$LOQ = 0,00841 + 5 * (0,0101)$$

$$LOQ = 0,5892 \text{ mg/ml}$$

$$LOQ = 58,92 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

Límite de detección:

$$LOD = m + 3 DE$$

$$LOD = 0,00841 + 3 * (0,0101)$$

$$LOD = 0,03872 \text{ mg/ml}$$

$$LOD = 38,72 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

Anexo V. Determinación de precisión.

Los resultados de la tabla 17 y 18 se obtuvieron empleando la misma metodología, similares condiciones y diferente analista. Se realizó un test ANOVA para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 17. Datos obtenidos para determinación de repetibilidad.

Analista 1: Corina Loja			
Día	Área	X	mg/ml
1	5333,4829	21,2747811	0,2127
2	6121,9761	21,66965951	0,2167
3	5741,1631	21,47894787	0,2148
4	6466,4106	21,84215274	0,2184
5	5902,0137	21,55950205	0,2156
6	5568,6123	21,3925342	0,2139
7	6188,5562	21,7030029	0,217
8	5783,7671	21,500284	0,215
9	6380,0586	21,79890755	0,218
10	6653,0649	21,93562946	0,2194
Media			0,2161
Desviación estándar			0,0021
Coeficiente de variación			0,9740

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Tabla 18. Datos obtenidos para determinación de reproducibilidad.

Analista 2: Mgtr. Natalí Solano			
Día	Área	X	mg/ml
1	5316,2129	21,26613226	0,2127
2	5917,98	21,567498	0,2157
3	5592,4365	21,40446539	0,214
4	6453,4487	21,83566141	0,2184
5	5494,4365	21,35538687	0,2136
6	6252,3345	21,73494316	0,2173
7	5748,3794	21,4825618	0,2148
8	6128,5054	21,67292939	0,2167
9	5865,9624	21,54144752	0,2154
10	6536,4653	21,87723623	0,2188
Media			0,2157
Desviación estándar			0,0020
Coeficiente de variación			0,9485

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Tabla 19. Análisis ANOVA para determinación de precisión del método.

Análisis ANOVA						
Test 1	21,27	21,47	21,55	21,7	21,79	107,78
Test 2	21,66	21,84	21,39	21,5	21,93	108,32
S	42,93	43,31	42,94	43,2	43,72	216,1
S ²	1842,98	1875,75	1843,84	1866,24	1911,43	46699,21
Suma Total de S ² (Yi ²)	9340,263					
Suma de cuadrados (Ci) ²	4670,3186					
CUADRADO DE CUADRADOS MEDIOS Entre-grupos y dentro-grupos						
Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)		Cuadrado medio (MS)		
Entre-grupos Sse	0,2105	4		0,052625		
Dentro-grupos SSd	0,1871	5		0,03742		
Total SSt	0,3976	9				

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Tabla 20. Porcentaje de Repetibilidad y Reproducibilidad.

%CV Repetibilidad	Analista 1: Corina Loja	0,97%
%CV Reproducibilidad	Analista 1: Corina Loja	0,97%
	Analista 2: Mgtr. Natalí Solano	0,94%

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Anexo VI. Determinación de porcentaje de recuperación.

Para analizar el parámetro de recuperación, es necesario conocer el valor de la masa de la matriz empleada en la concentración que se está trabajando. En este caso se trabajó con una concentración de carnosol de 500 mg/L, a partir de dicha concentración se obtiene el valor de la masa de la siguiente manera:

$$C = \frac{m}{v} = \frac{500mg}{1L} * \frac{1L}{1000ml} * \frac{1ml}{1000\mu l} = 0,0005 \frac{mg}{\mu l}$$

$$m = C * v$$

$$m = 0,0005 \frac{mg}{\mu l} * 500 \mu l$$

$$m = 0,25 mg$$

A continuación se emplea la ecuación para la determinación del porcentaje de recuperación:

$$\%R = \frac{Ea - Ep}{m} * 100$$

Donde:

Ea= Estándar adicionado.

Ep= Estándar con extracto puro.

m= masa

Ejemplo:

$$\%R = \frac{Ea - Ep}{m} * 100$$

$$\%R = \frac{0,45051mg - 0,21275 mg}{0,25 mg} * 100$$

$$\%R = 95,11\%$$

Tabla 21. Datos obtenidos para determinación de porcentaje de recuperación.

Analista	N°	Masa de carnosol en extracto puro (mg)	Masa de carnosol en extracto adicionado (mg)	% de Recuperación
Analista 1 Corina Loja	1	0,21275	0,45051	95,11
	2	0,2167	0,47977	105,2
	3	0,21479	0,4863	108,6
	4	0,21842	0,47243	101,6
	5	0,2156	0,46391	99,33
	6	0,21393	0,49041	110,6
	7	0,21703	0,47372	102,7
	8	0,215	0,50492	116
	9	0,21799	0,47504	102,8
	10	0,21936	0,47947	104
Analista 2 Mgtr. Natalí Solano	1	0,21266	0,44672	93,62
	2	0,21567	0,48486	107,7
	3	0,21404	0,46457	100,2
	4	0,21836	0,47372	102,1
	5	0,21355	0,46145	99,16
	6	0,21735	0,46241	98,02
	7	0,21483	0,47386	103,6
	8	0,21673	0,49877	112,8
	9	0,21541	0,46933	101,6
	10	0,21877	0,47053	100,7

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

Anexo VII. Cuantificación de carnosol.

Se calculó la concentración (C_i) en el extracto a través de la ecuación de la recta, con el fin de obtener la concentración exacta de carnosol presente en el extracto:

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

m= pendiente

b= intercepto

y= área de pico (6013,91055)

$$x = \frac{6013,91055 - 17972}{1668,2}$$

$$x = \frac{6013,91055 + 17972}{1668,2}$$

$$x = 14,3783 \frac{ng}{\mu l}$$

$$x = 0,0143783 \frac{mg}{ml}$$

Se determinó el porcentaje de carnosol a través de la siguiente ecuación:

$$\%Carnosol = \frac{C_i * Volumen de aforo}{Peso extracto} * 100$$

$$\%Carnosol = \frac{0,014378 \text{ mg/ml} * 10 \text{ ml}}{5 \text{ mg}} * 100$$

$$\%Carnosol = 2,87\%$$

Anexo VIII. Método de ensayo: Determinación de carnosol

1. Alcance

El método es adecuado para determinar carnosol en extractos de material vegetal o en otras matrices propuestas.

2. Descripción de tipo de ítem

La muestra es extracto total de acetato de etilo obtenido de la especie *Lepechinia mutica*.

3. Principio

La determinación y cuantificación de carnosol se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

4. Parámetro y rango

(100 ng/μl – 800 ng/μl), para muestras con una concentración mayor se debe realizar una dilución.

5. Medidas de seguridad.

Utilizar barreras de protección primaria (guantes, mascarilla y mandil), tener precaución con los reactivos a emplear (acetonitrilo y ácido fórmico) ya que son inflamables y corrosivos.

6. Equipos y materiales

- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas.
- Balanza analítica.
- Balón de aforo de 10 ml.
- Micropipeta de 1000 μl.
- Probeta de 100 ml.
- Frascos Boeco de 1000 ml.
- Viales ámbar de 1,5 ml.
- Pipetas Pasteur.

7. Reactivos

Tabla 22. Tabla de reactivos empleados

Reactivo	Fórmula	Concentración
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	99,95%
Ácido Fórmico	CH ₂ O ₂	99,95%
Metanol	CH ₃ OH	99,95%
Agua	H ₂ O	99,95%

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

8. Descripción del procedimiento

8.1. Marcas de Identificación.

El laboratorio etiqueta y codifica cada muestra.

8.2. Manipulación de ítems de ensayo.

Las muestras se manipulan con precaución para evitar pérdida o deterioro.

8.3. Almacenamiento de los ítems de ensayo.

Las muestras se almacenan en congelación a temperatura de -10°C .

8.4. Verificaciones previas.

Antes de realizar la lectura de las muestras se debe realizar una curva de calibración con estándares para el rango especificado, asegurándose de obtener un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,995.

8.5. Preparación de estándares de calibración.

A partir de un estándar de $1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ se prepararon cinco niveles de concentración teórica conocida, con los que se elaboró una curva de calibración para determinar la linealidad del método.

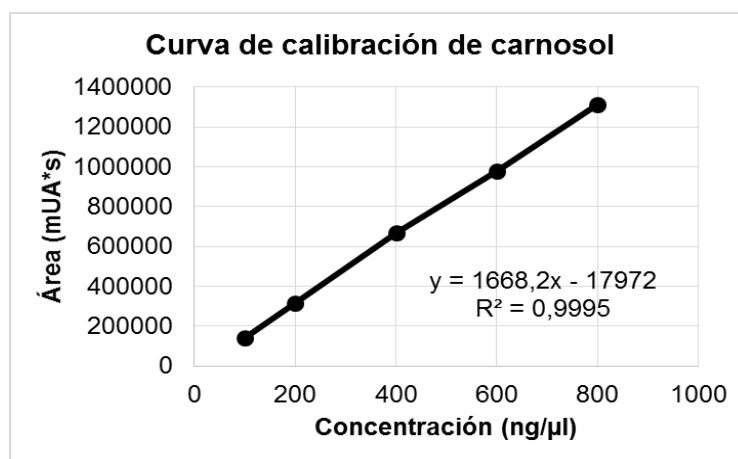


Figura 14. Curva de calibración de carnosol.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

8.6. Registro y observación de resultados.

La información obtenida se registra en hojas de cálculo de Excel codificada para cada muestra.

8.7. Metodología.

Las condiciones del equipo se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 23. Condiciones cromatográficas para determinación de carnosol.

Columna	Eclipse plus C18 (2,1 x 150 mm) (Tamaño de partícula: 5 µm)
Detector	Diodos a 280 nm
Espectrómetro de masas	Peso molecular: 331 g/mol
Fase móvil	Solvente A (Acetonitrilo 30% / Agua 70% / 0,1% de ácido fórmico). Solvente B (Acetonitrilo 60% / Agua 40% / 0,1% de ácido fórmico).
Flujo	0,5 ml/min
Modo	Gradiente: <ul style="list-style-type: none">▪ 0 – 4 minutos: 100% A / 0% B▪ 4 – 17 minutos: 50% A / 50% B▪ 17 – 20 minutos: 0% A / 100% B▪ 20 – 25 minutos: 100% A / 0% B
Volumen de inyección	5 µl

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

9. Preparación de las muestras

Pesar 10 mg de carnosol aforar con metanol grado HPLC en un balón de 10 ml, obtener una concentración final de 1000 ng/µl, a partir de esta solución patrón se prepara los siguientes estándares:

- 100 ng/µl: Tomar 150 µl de solución patrón y añadir 1350 µl de metanol grado HPLC.
- 200 ng/µl: Tomar 300 µl de solución patrón y añadir 1200 µl de metanol grado HPLC.
- 400 ng/µl: Tomar 600 µl de solución patrón y añadir 900 µl de metanol grado HPLC.
- 600 ng/µl: Tomar 900 µl de solución patrón y añadir 600 µl de metanol grado HPLC.
- 800 ng/µl: Tomar 1200 µl de solución patrón y añadir 300 µl de metanol grado HPLC.



Figura 15. Preparación de estándares para la curva de calibración.

Fuente: Autora, 2019.

Elaboración: Autora, 2019.

9.1. Lectura de la muestra.

Una vez preparados los estándares se procede a analizar en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas.