

PRÁCTICA OPTATIVA - 2023
FaCENA - UNNE

Desarrollo de un método cromatográfico (HPLC) para cuantificación de cumarinas

ALUMNA: Toro Reolín, Ana Paula
DIRECTORA: Dra. Monzón, Celina María

Res. 1804/22 D.



ÍNDICE

1	OBJETIVOS.....	2
2	INTRODUCCIÓN	2
2.1	CUMARINAS	2
2.1.1	Estructura, propiedades y aplicaciones.....	2
2.1.2	Ingesta Diaria Tolerable (IDT).....	3
2.1.3	Regulación de cumarina en alimentos.....	4
2.2	CANELA.....	4
2.2.1	Propiedades y aplicaciones.....	4
2.2.2	Tipos de canela.....	6
2.3	MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CUMARINAS.....	7
3	MATERIALES.....	8
4	MÉTODOS.....	10
4.1	Procesamiento de cristales de cumarina	10
4.2	Espectro de absorción	10
4.3	Curva de calibración	11
4.4	Procesamiento de muestras comerciales de canela.....	11
5	RESULTADOS.....	13
5.1	Espectro de absorción	13
5.2	Curva de calibración	13
5.3	Aplicación: cuantificación de cumarinas en muestras de canela comercial	15
6	DISCUSIÓN	17
7	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	18
8	CONCLUSIÓN	20
9	BIBLIOGRAFÍA.....	21

1 OBJETIVOS

Generales:

1. Brindar a la alumna que está finalizando el Ciclo de Formación Profesional, un espacio curricular que le permita profundizar su capacitación en distintos campos disciplinares de la Bioquímica.
2. Posibilitar un mayor desarrollo de competencias en aspectos no tradicionales del perfil profesional y que presentan una importante demanda como: Análisis Instrumental, Investigación Básica, Investigación Aplicada.
3. Adquirir destreza en el desarrollo de técnicas instrumentales para la determinación de analitos e interpretación de resultados.

Particulares:

1. Llevar a cabo la puesta a punto y optimización de un método de cuantificación para cumarinas por HPLC.
2. Proveer una amplia visión del desarrollo de un método analítico y su validación según criterios internacionales.
3. Aplicar el método: dosar cumarinas en muestras de canela.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 CUMARINAS

2.1.1 Estructura, propiedades y aplicaciones

El nombre 'cumarina' proviene del término francés "Coumarou" usado para referirse al árbol del cual se aisló por primera vez en 1820, cuyo nombre científico es *Dipteryx odorata*.

Las cumarinas son productos naturales con características aromáticas y fragantes, muy extendidas en todo el reino vegetal. Se encuentran en diferentes fuentes vegetales, como verduras, especias, frutas y plantas medicinales. Se distribuyen de manera diferente en todas las partes de las plantas, por lo tanto, se las puede encontrar en las semillas, flores, hojas, raíces y tallos de las mismas. También se las puede encontrar en algunos productos alimenticios ampliamente utilizados, como los aceites (oliva, soja, maní, maíz), café, nueces, vino y té.

Las cumarinas (1,2-benzopironas) representan una familia importante de compuestos de benzopirona naturales, todos los cuales consisten en un anillo de benceno unido a un anillo de pirona.

Las cumarinas naturales se pueden dividir en seis grupos básicos de la siguiente manera: cumarinas simples, furanocumarinas (tipo lineal y tipo angular), piranocumarinas (tipo lineal y tipo angular), bisumarinas, benzocumarinas y cumestanos (Figura 1).

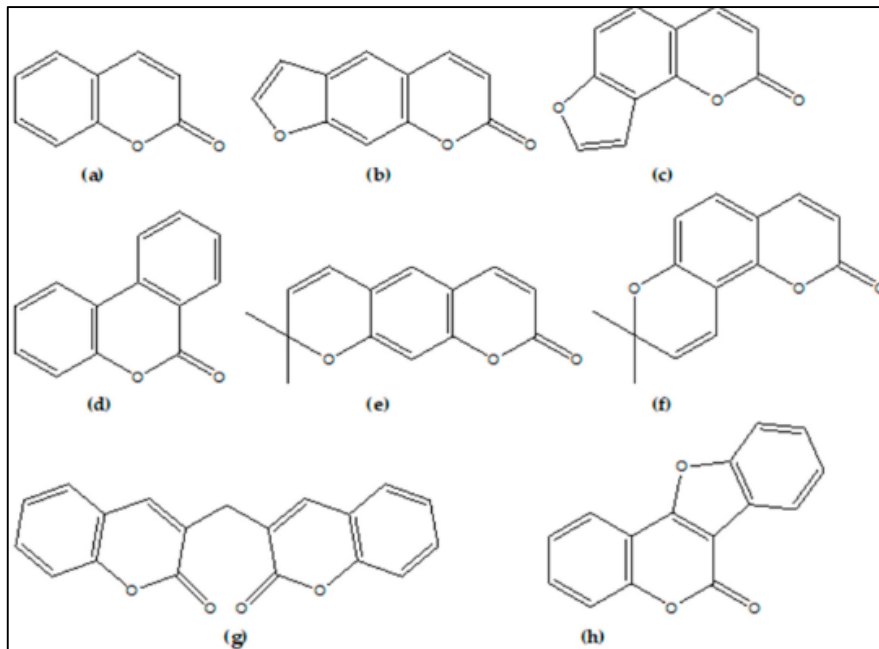


Figura 1. Grupos básicos de cumarinas naturales: (a) cumarinas simples; (b) furanocumarinas (tipo lineal); (c) furanocumarinas (tipo angular); (d) benzocumarinas; (e) piranocumarinas (tipo lineal); (f) piranocumarinas (tipo angular); (g) biscumarinas; (h) cumestano. (Lončar *et al.*, 2020).

Las cumarinas se consideran metabolitos vegetales secundarios que protegen a la planta de infecciones, con un papel importante en la bioquímica y fisiología vegetal; actúan como antioxidantes, inhibidores enzimáticos y precursores de sustancias tóxicas. Además, estos compuestos están involucrados en la actividad de las hormonas de crecimiento vegetal y los reguladores del crecimiento, el control de la respiración y la fotosíntesis.

Las cumarinas y sus derivados poseen una amplia gama de propiedades biológicas que dependen principalmente de su estructura química. Como ser: agentes antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios, agentes anti-VIH, agentes anticancerígenos, anticoagulantes, agentes antivirales, agentes antituberculosos. Por lo que sus numerosas propiedades la han llevado a su aplicación en la producción de fármacos, cosméticos, agroquímicos, así como en la industria alimentaria.

Las cumarinas poseen un olor dulce, a menudo comparado con el aroma de la vainilla. Debido a su olor reconocible y agradable y a la posibilidad de actuar como agente fijador y potenciador en perfumería, las cumarinas se han utilizado en la industria de la perfumería desde 1882. También se han utilizado como sustancias aromáticas en otras preparaciones cosméticas, como geles de ducha, champú, pasta de dientes, jabones de tocador, jabones íntimos, espumas de afeitar, cremas corporales, cremas faciales, cremas de manos, desodorantes, protectores solares, lociones para después del afeitado y barras de labios. (Lončar *et al.*, 2020).

2.1.2 Ingesta Diaria Tolerable (IDT)

En estudios realizados en ratas que fueron alimentadas con dosis muy altas de cumarina durante largos períodos, se descubrió que la misma puede tener efectos hepatotóxicos. Estos efectos hepatotóxicos aún no están claramente confirmados en humanos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la evidencia de hepatotoxicidad por cumarina al analizar la seguridad para la salud de su ingesta. (Lončar *et al.*, 2020).

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece una ingesta diaria tolerable (que define la cantidad de cumarina que una persona puede ingerir diariamente a lo largo de su vida sin riesgo apreciable para la salud). La cual es de 0,1 mg cumarina/kg de peso corporal. (Muñoz Escurra, 2021).

2.1.3 Regulación de cumarina en alimentos

El Código Alimentario Argentino establece, en su capítulo XVIII de Aditivos Alimentarios, la concentración máxima permitida de determinadas sustancias cuando estén presentes en los productos alimenticios por causa de la utilización de aromatizantes. En donde establece un máximo permitido de cumarina en alimentos y bebidas de 2,0 mg/kg; con una excepción de hasta 10 mg/kg para bebidas alcohólicas y para productos elaborados con leche o que contengan dulce de leche. Además, incluye a la cumarina dentro de las sustancias que no deben ser adicionadas como tal a los productos alimenticios o a los aromatizantes/saborizantes. Si no que, establece que puede aparecer en el producto alimenticio en estado natural, luego de la adición de aromatizantes/saborizantes preparados a partir de materias primas naturales. (CAA, 2018).

Hoy en día, la exposición dietética a las cumarinas es bastante significativa debido a su presencia, como se mencionó al comienzo, en las verduras, frutas, semillas, y otras fuentes alimenticias, mientras que la mayor contribución de la ingesta es sin duda a través del consumo de canela y alimentos que contienen canela. Y aunque la canela es la principal fuente de cumarina de los alimentos, actualmente no existe un valor límite para la cumarina en la canela. (Lončar *et al.*, 2020).

2.2 CANELA

2.2.1 Propiedades y aplicaciones

La canela corresponde a la corteza de diversas especies pertenecientes al género *Cinnamomum*, que comprende más de 250 especies de árboles y arbustos, de la familia de las Lauraceae, conocidos como caneleros.

Se trata de árboles perennes con hojas opuestas, coriáceas, ovaladas, con tres (raramente cinco) nervios prominentes. Cuando las hojas son jóvenes son de color rojizo adquiriendo color verde oscuro al madurar. Las flores son pequeñas, de color amarillo pálido. Los frutos son de forma ovoide con una semilla (Figura 2). (Carretero Accame, 2009).



Figura 2. *Árbol de canela.* (Carretero Accame, 2009).

La canela ha sido conocida desde la antigüedad como uno de los productos más importantes, debido a sus propiedades culinarias y medicinales. Se encuentran referencias donde se indica como antiemético, antidiarreico, estimulante. También se la utiliza para tratar trastornos digestivos como flatulencia, digestiones lentas y pérdida de apetito, y en ginecología para tratar padecimientos como amenorrea y dismenorrea. Algunos facultativos emplean además el aceite esencial para el tratamiento de infecciones urinarias, pues se ha comprobado su actividad bacteriostática urinaria. Además, diversos ensayos farmacológicos han puesto de manifiesto sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. Una de las actividades más estudiadas atribuidas a la canela es la actividad hipoglucemiante ligada a la hipocolesterolemia. Además, se ha comprobado una potente actividad antioxidante.

El cinamaldehído, uno de los principales componentes de la canela, es además el principal responsable del sabor en todas las especies de *Cinnamomum*. Por su delicado y dulce aroma y sabor especiado, la canela ha sido y es muy utilizada como especia. Es conocido su uso en la preparación de postres, bizcochos, tortas, chocolates, chocolate caliente, té, bebidas, en decoración y en platos aromatizantes como carnes, pescados, salsas. Además, debido a sus propiedades refrescantes y la posibilidad de eliminar el mal aliento, la canela también se usa como agente saborizante en chicles o pastas dentales. Por todo esto es que la canela se ha utilizado en la industria de los aromatizantes, la medicina y la perfumería.

Si bien la canela, como se mencionó, proviene de la parte central seca de la corteza, vale mencionar que casi todas las partes del árbol de la canela, incluidas la corteza, las hojas, las flores, los frutos y las raíces, se pueden usar en los fines medicinales o culinarios. (Carretero Accame, 2009; Lončar *et al.*, 2020).

La canela se caracteriza por tener una gran cantidad de vitaminas y minerales, así como compuestos bioactivos, siendo los polifenoles y el cinamaldehído los más comunes. La cantidad de sus componentes es variable, ya que dependen de diversos factores como ser: la especie, propiedades del suelo, la parte de la planta, condiciones ambientales y geográficas, los tiempos de cosecha, las condiciones de recolección y producción, así como los métodos de extracción y análisis. (Lončar *et al.*, 2020).

2.2.2 Tipos de canela

Según el lugar de origen de la planta, existen diferentes tipos de canela. Como se mencionó, existen más de 250 especies, pero, sin embargo, existen cuatro especies de canela muy utilizadas para obtener la canela especiada:

- Canela de Ceilán, también conocida como “Canela Verdadera” o “Canela Mexicana” (del género *Cinnamomum verum* o *Cinnamomum zeylanicum*), originaria de Sri Lanka (antigua Ceilán); El canelero de Ceilán se cultiva principalmente en Sri Lanka. Generalmente se presenta desprovista de súber (capa protectora externa) en forma de canutos enrollados debido a la presencia en su parénquima cortical de un anillo de células pétreas que cuando la corteza se deseca origina un plegamiento hacia el interior de la misma. También es frecuente su presentación en forma pulverizada.
- Canela Cassia o Canela China, originaria de China (del género *Cinnamomum cassia*);
- Canela de Indonesia originaria de las regiones de Sumatra y Java (del género *Cinnamomum burmannii*), y
- Canela Vietnamita originaria de Vietnam (del género *Cinnamomum loureiroi*).

A excepción de la canela que proviene del canelero de Ceilán, las demás se suelen presentar tal como se obtienen de los árboles, es decir con el súber, por lo que aparecen en forma de fragmentos solo débilmente curvados.

La canela se puede agregar a la comida de forma entera o picada, también como extractos o aceites que se producen a partir de hojas o corteza de canela. (Carretero Accame, 2009; Lončar *et al.*, 2020).

La canela de Ceilán y Cassia se utilizan principalmente como especias. Ambas especies son similares entre sí, pero presentan diferentes propiedades fisicoquímicas, sensoriales y precio en el mercado. Las ramas de la canela provenientes de *Cinnamomum verum* están formadas por muchas capas finas que se rompen con facilidad, son de color marrón claro y presentan un sabor y aroma dulce y ligero. Por su parte, las ramas provenientes de *Cinnamomum cassia* son más oscuras y gruesas, formadas por una única capa muy dura y difícil de romper, con un sabor y aroma más intenso y especiado. Cuando se encuentran en la forma de rama se pueden diferenciar con facilidad, pero en polvo resulta muy complicado distinguirlas.

A pesar de sus características sensoriales, la principal diferencia entre ellas es su precio comercial y contenido en cumarina. Siendo Cassia el tipo que contiene un mayor contenido de cumarina en comparación con la “canela verdadera”. En la canela Cassia, el contenido de cumarina es de hasta el 1 %, mientras que en la canela de Ceilán es muy bajo (trazas), alrededor del 0,004 % lo que la convierte en la más beneficiosa y segura para el consumo regular (Lončar *et al.*, 2020; Muñoz Escurra, 2021).

Sumando a esto, se encontraron estudios realizados por Wang *et al.* (2015) donde trabajaron con muestras de rama auténticas de las cuatro especies principales de canela (*C. verum*, *C. cassia*, *C. burmannii*, *C. loureiroi*), también trabajaron con muestras comerciales en rama y polvo de canela y además con complementos alimenticios a base de canela y alimentos con sabor a canela, y de dichos estudios se desprende que la

concentración de cumarina en las muestras auténticas (determinadas por método UPLC-UV) fueron las siguientes:

Cinnamomum verum: 0,017 g/kg → 0,0017 %

Cinnamomum cassia: 0,310 g/kg → 0,031%

Cinnamomum burmannii: 2,14 g/kg → 0,214%

Cinnamomum loureiroi: 6,97 g/kg → 0,697%

Lo que acompaña a lo explicado por Lončar *et al.* (2020) y Muñoz Escurra (2021) con respecto a que la canela de Ceilán es la más segura para su consumo por su menor contenido en cumarina (trazas).

Teniendo en cuenta el precio, la canela Ceilán tiene un precio más alto en el mercado en comparación con la canela Cassia. Al ser la canela Cassia más barata, hace que cada vez esté más extendida en el mercado europeo mientras que la “canela verdadera” tiene un coste comercial mayor y, por tanto, es más susceptible de ser adulterada con la primera. (Lončar *et al.*, 2020; Muñoz Escurra, 2021).

Por otro lado, la canela en presentación de rama y la canela molida contienen diferentes cantidades de cumarina; las vainas de canela suelen contener una mayor cantidad de cumarina en comparación con la canela molida.

Aunque la canela puede tener efectos beneficiosos para la salud humana, una gran cantidad de canela puede tener efectos negativos, ya que la canela contiene altos niveles de cumarina.

En la actualidad, una exposición estimada a la cumarina plantea las mayores incertidumbres debido a la falta de mediciones sistemáticas de sus niveles en los alimentos. La industria alimentaria europea se queja de que la normativa europea es demasiado rigurosa y aboga por que la cumarina en los alimentos no suponga un riesgo para la salud humana. Sin embargo, por temor a su mercado, algunos productores de galletas han decidido cambiar sus recetas para reducir la cantidad de cumarina en sus productos, mientras que otros están tratando de lograr niveles muy bajos de cumarina en sus productos utilizando varios aromas similares a la canela. (Lončar *et al.*, 2020).

2.3 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CUMARINAS

Dada la presencia de cumarinas y derivados de cumarinas en numerosas plantas y, en consecuencia, en alimentos, muchos investigadores han desarrollado métodos para la detección y cuantificación de cumarinas y sus derivados. Los primeros métodos para determinarlas incluían cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, así como ensayos colorimétricos y polarografía.

En la literatura más reciente, se proponen varios métodos diferentes para la determinación de cumarinas, incluida la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con UV y fluorescencia, así como la espectrometría de masas. Todos estos métodos tienen sus ventajas y limitaciones, que en la mayoría de los casos incluyen el costo financiero de equipos y capacitación, así como el aspecto ambiental del consumo de grandes cantidades de solventes orgánicos y el consumo de energía. Además, un gran problema con la detección simultánea de un gran número de cumarinas es la diversidad en

estructura y por lo tanto en la polaridad de diferentes cumarinas. Los métodos de detección y cuantificación utilizados deben ser aplicables a diferentes muestras, sensibles a bajas concentraciones, así como reproducibles y precisos. Hoy en día, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método más utilizado. (Lončar *et al.*, 2020).

3 MATERIALES

- Cristales de cumarina (C₉H₆O₂): provistos por la Dra. Ana María Torres del Laboratorio de Productos Naturales de la facultad (Figura 3).
- Canela comercial: en la presentación de polvo (molida) y rama, adquiridas en un supermercado de la ciudad de Corrientes Capital. Además, se dispuso de una muestra de canela en polvo proveniente de una empresa de la ciudad de Bella Vista, provista por el Dr. Mario Raúl Delfino (Figura 4).
- Balanza analítica (Figura 5).
- Agitador magnético (Figura 6).
- Centrífuga (Figura 7).
- Espectrofotómetro UV-Visible Metash Instruments UV-5100B y cubetas de cuarzo UV (Figura 8).
- Cromatógrafo HPLC Agilent 1120 Compact con bomba isocrática. Detección UV-Vis. (Figura 9).
- Material de laboratorio en general: pipetas, propipeta, tubos de centrífuga, matraces aforados, micropipeta, etc.



Figura 3. Cristales de cumarina



Figura 4. Muestras de canela comercial. De izquierda a derecha: canela molida (muestra a), canela molida-Bella Vista (muestra b), canela en rama (muestra c)

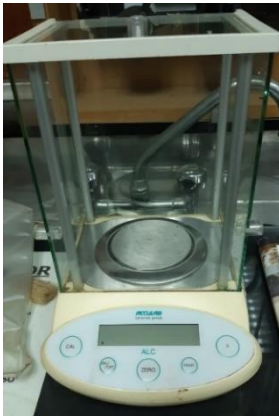


Figura 5. Balanza analítica



Figura 6. Agitador magnético



Figura 7. Centrifuga



Figura 8. Espectrofotómetro UV-Vis y cubetas de cuarzo



Figura 9. Cromatógrafo HPLC

4 MÉTODOS

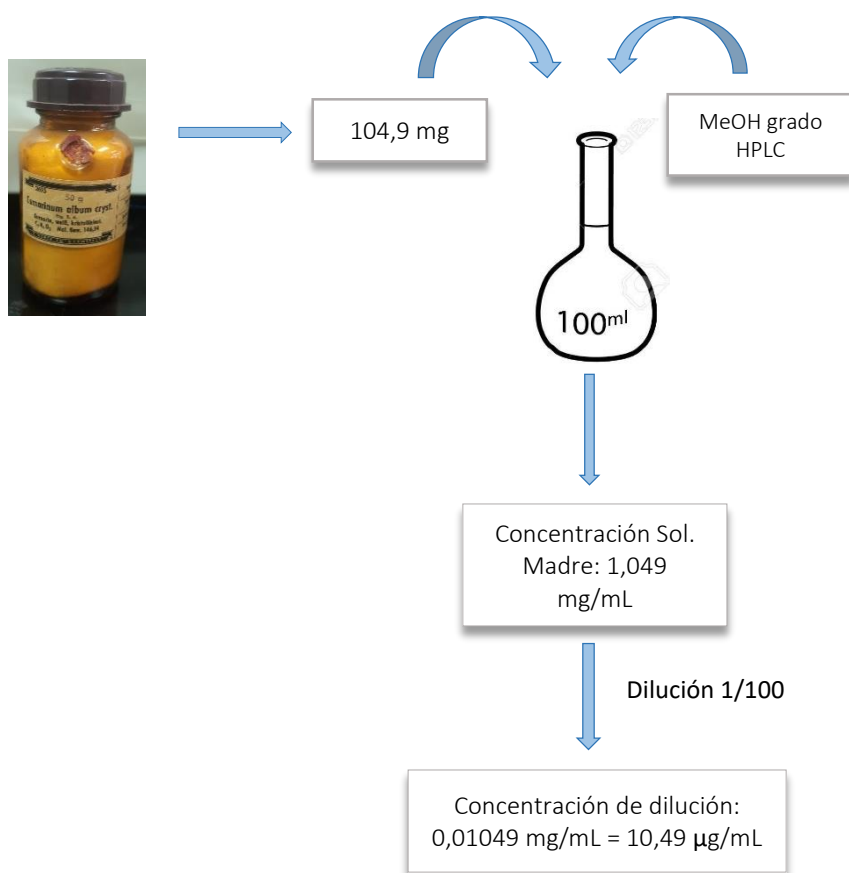
- ❖ Para la puesta a punto de un método para cuantificar cumarinas por HPLC, se usaron como referencia los estudios realizados por Nava Álvarez *et al.* (2015).

4.1 Procesamiento de cristales de cumarina

Se preparó una Solución Madre de 1,049 mg/mL, usando metanol (MeOH) grado HPLC como solvente.

De dicha solución se realizó una dilución 1/100, usando agua destilada como solvente, siendo la concentración final de esta dilución de 0,01049 mg/mL = 10,49 µg/mL.

Esquema de trabajo:



4.2 Espectro de absorción

Se utilizó el espectrofotómetro para obtener el espectro de absorción de los cristales de cumarina a partir de la dilución 1/100 de la Solución Madre, por ser esta última muy concentrada para usarla con este fin. Para ello se midieron las absorbancias en el rango del Ultravioleta (UV), es decir, de 200 a 400 nm. Usando agua destilada como blanco.

A partir del espectro de absorción se obtuvo la longitud de onda a la cual la sustancia en estudio (cumarina) presenta la máxima absorbancia, la cual fue seleccionada como longitud de onda de trabajo.

4.3 Curva de calibración

La curva de calibración es necesaria para hallar la concentración de cumarina en las muestras comerciales de canela. Para ello, se hizo uso del HPLC y la longitud de onda de máxima absorbancia de la cumarina, determinada a partir del espectro de absorción.

Para las corridas cromatográficas se dispuso del HPLC Agilent 1120 con detector de UV-Vis; columna C-18 de 15cm de longitud. La separación cromatográfica fue realizada a temperatura ambiente. La elución empleada fue del tipo isocrática, con un flujo de un 1.0 mL/min empleando como fase móvil una solución metanol:agua (80:20) y trabajando a una longitud de onda de 276 nm. Volumen de inyección: 20 μ L. Tiempo de corrida: 5 minutos.

Se prepararon siete soluciones patrones (llamadas como “patrón a” al “patrón g”) a partir de la Solución Madre, usando agua destilada como solvente. Cada solución patrón se corrió por triplicado y bajo las condiciones de corrida detalladas anteriormente.

4.4 Procesamiento de muestras comerciales de canela

- ❖ Para el procesamiento y evaluación del contenido de cumarina en las muestras comerciales de canela por HPLC, se usó como referencia y una guía, los estudios realizados por Wang *et al.* (2013). Cabe aclarar que por distintos motivos, como ser disponibilidad de materiales, la técnica empleada no fue una copia exacta de la propuesta por los investigadores, si no que se buscaron y usaron alternativas ante las adversidades.

Con respecto a la canela en presentación en forma de rama (muestra c), primeramente se procedió a triturar trozos de rama en un mortero (Figura 10). Luego se la procesó igual que las muestras de canela cuyas presentaciones fueron inicialmente en polvo (muestras a y b).

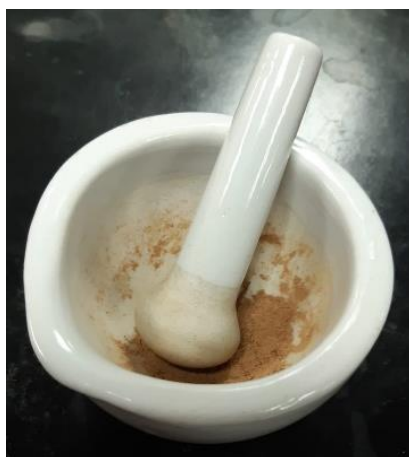


Figura 10. Muestra triturada de canela en rama (muestra c)

Esquema de trabajo:

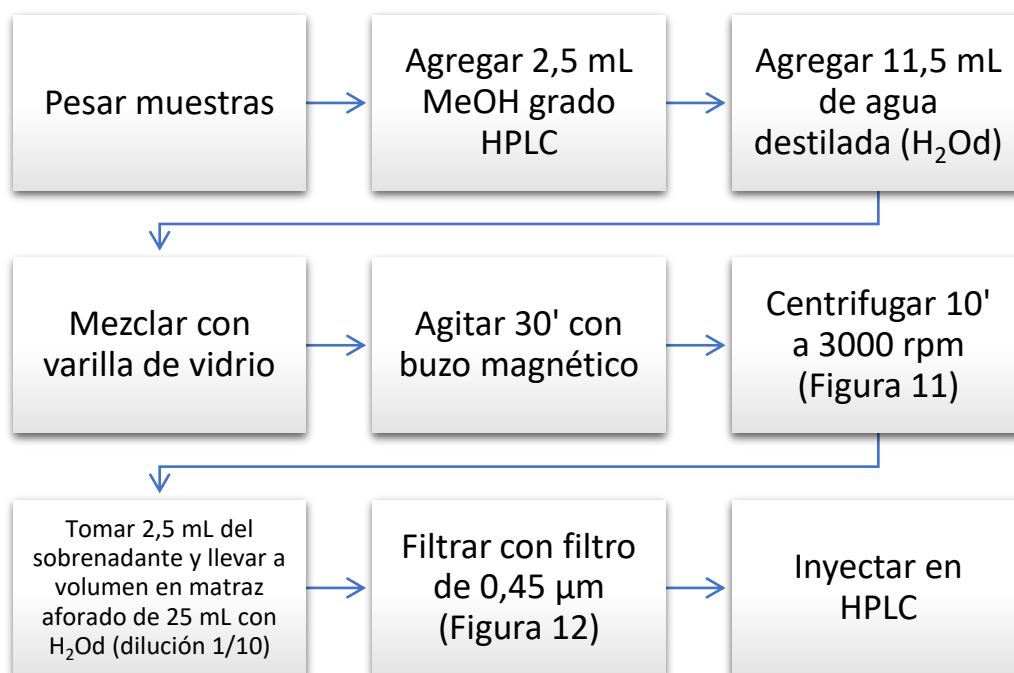


Figura 11. Muestras centrifugadas (de izquierda a derecha: muestra c - muestra b - muestra a)



Figura 12. Filtro de 0,45 µm colocado en jeringa con la muestra a filtrar

Las masas pesadas de cada muestra fueron las siguientes:

Masa muestra a: 0,1010 gr

Masa muestra b: 0,1002 gr

Masa muestra c: 0,1003 gr

Vale aclarar que, al igual que cada solución patrón, cada muestra de canela procesada se inyectó por triplicado en el HPLC, y las condiciones de la cromatografía fueron las mismas que las usadas para los patrones.

5 RESULTADOS

5.1 Espectro de absorción

De los resultados del espectro de absorción (Figura 13) se conoce que la longitud de onda de máxima absorción de la cumarina es 276 nm. Por lo que dicha longitud de onda fue la seleccionada para realizar las corridas cromatográficas.

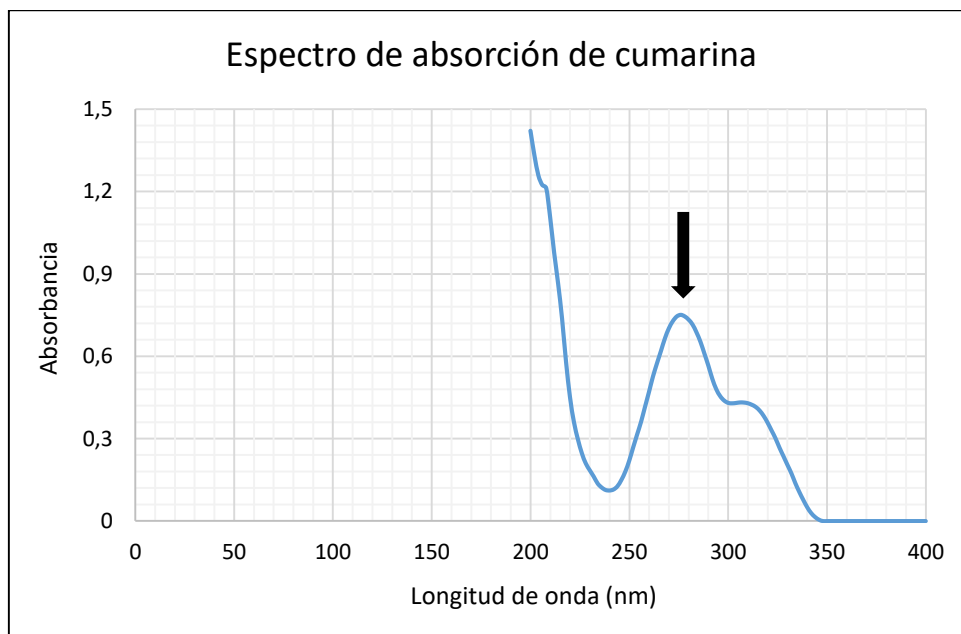


Figura 13. Espectro de absorción de la cumarina (se señala con la flecha la longitud de onda de máxima absorción)

5.2 Curva de calibración

Se procesaron por triplicado cada una de las siete soluciones patrones (“patrón a” hasta “patrón g”) (Tabla 1). Obteniéndose un respectivo cromatograma en cada caso (Figura 14).

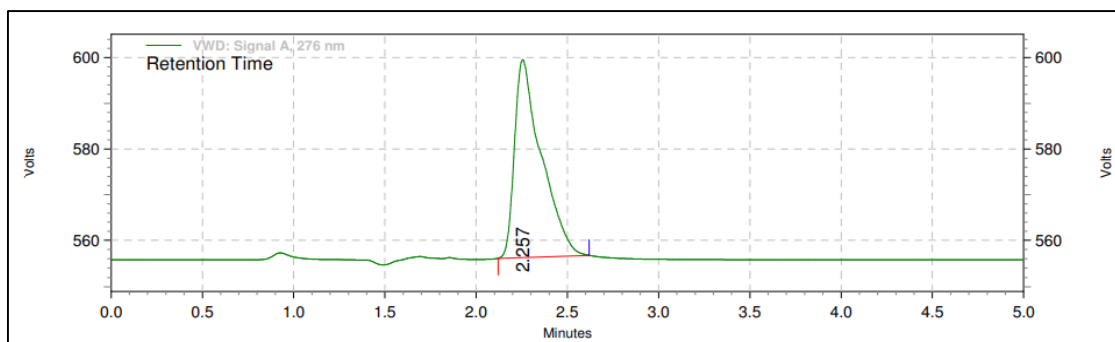


Figura 14. Ejemplo de cromatograma: **Patrón a-1**

Tabla 1. Resultados de las corridas cromatográficas de las soluciones patrones (por triplicado)

Patrón	Concentración (µg/ml)	Tiempo de Retención (min)	Área bajo la curva
Patrón a-1	5,24	2,257	7.422.175
Patrón a-2	5,24	2,250	7.362.574
Patrón a-3	5,24	2,263	7.575.732
Patrón b-1	10,49	2,270	13.331.046
Patrón b-2	10,49	2,273	13.371.136
Patrón b-3	10,49	2,273	13.879.295
Patrón c-1	15,73	2,277	18.851.565
Patrón c-2	15,73	2,273	22.776.666
Patrón c-3	15,73	2,273	22.891.289
Patrón d-1	20,98	2,270	27.910.028
Patrón d-2	20,98	2,273	29.539.892
Patrón d-3	20,98	2,273	29.846.824
Patrón e-1	26,22	2,273	37.591.652
Patrón e-2	26,22	2,277	38.456.047
Patrón e-3	26,22	2,277	39.161.066
Patrón f-1	31,47	2,307	44.342.451
Patrón f-2	31,47	2,310	46.570.972
Patrón f-3	31,47	2,323	47.392.589
Patrón g-1	36,71	2,320	56.910.353
Patrón g-2	36,71	2,317	57.347.981
Patrón g-3	36,71	2,380	57.493.821

Se obtuvo la curva de calibración graficando Área bajo la curva (por triplicado) vs. Concentración de la solución patrón correspondiente (Figura 15). A partir de la curva se halló su ecuación y el coeficiente de correlación al cuadrado (R^2).

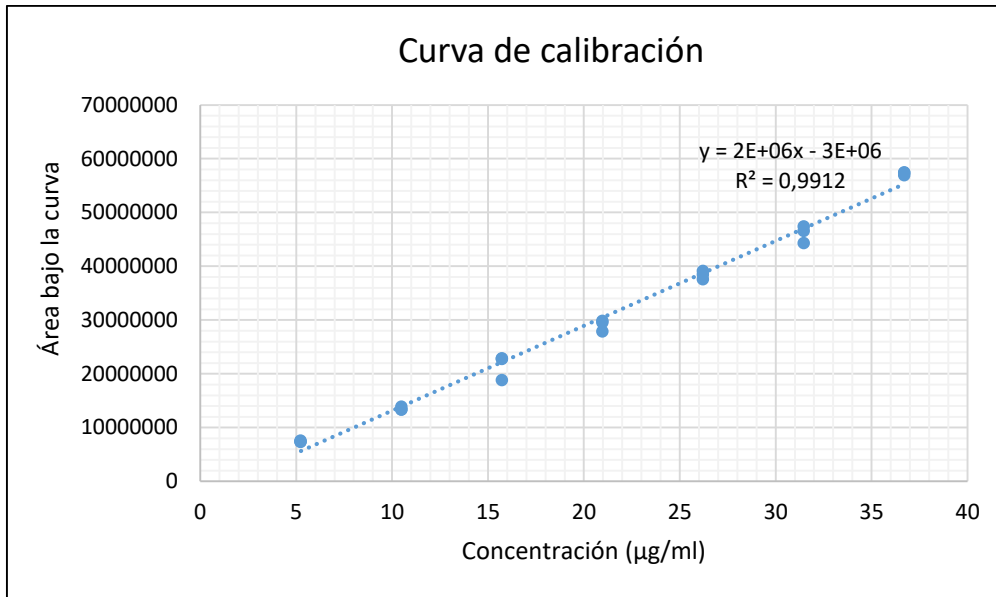


Figura 15. Curva de calibración de cumarina

5.3 Aplicación: cuantificación de cumarinas en muestras de canela comercial

Al inyectar las muestras de canela (a, b y c) por triplicado en el HPLC, se obtuvieron sus respectivos cromatogramas (Figura 16) y sus tiempos de retención y áreas bajo la curva. Usando la ecuación de la curva de calibración y con los datos de áreas bajo la curva, se calculó la concentración de cumarina en cada repetición de las muestras a, b y c, y finalmente se promediaron los resultados para cada muestra. Expresando el resultado final en g de cumarina/kg de muestra (Tabla 2).

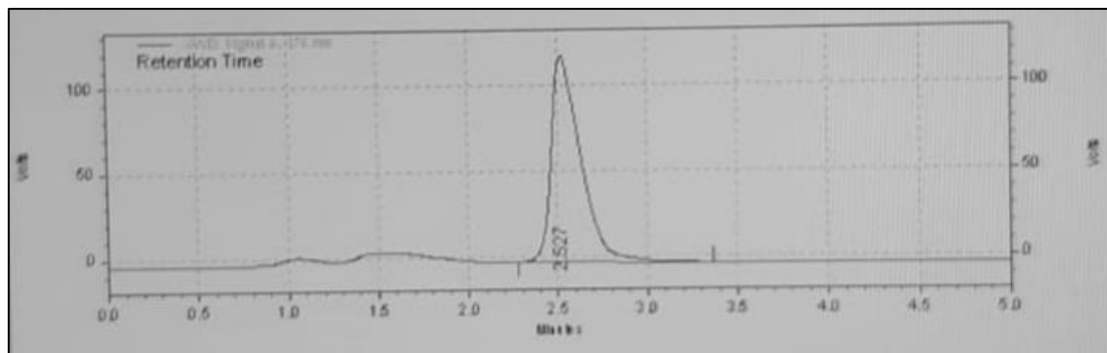


Figura 16. Ejemplo de cromatograma; **Muestra a-3**

Tabla 2. Resultados de Tiempo de Retención, Área bajo la curva y concentración de cumarina de muestras de canela a, b y c

Muestra	Tiempo de Retención (min)	Área bajo la curva	Concentración (g/kg)	Promedio concentración (g/kg)	% de cumarina
Muestra a-1	2,553	24.284.895	18,91		
Muestra a-2	2,537	23.647.615	18,47	18,45	1,84
Muestra a-3	2,527	22.945.029	17,98		
Muestra b-1	2,517	37.061.503	27,99		
Muestra b-2	2,547	38.622.193	29,08	28,70	2,87
Muestra b-3	2,557	38.548.234	29,03		
Muestra c-1	2,583	16.302.807	13,47		
Muestra c-2	2,503	18.645.280	15,11	14,41	1,44
Muestra c-3	2,517	17.985.921	14,65		

A continuación se demuestra un ejemplo de cómo hallar la concentración de cumarina, en este caso para la **muestra a – 1** (pero se debe aplicar para cada repetición de cada muestra y luego hallar el promedio):

Datos:

- Ecuación de curva de calibración: $y = 2.000.000 x - 3.000.000$
- Área bajo la curva (y): 24.284.895

Cálculos:

1. Con el área bajo la curva (y), reemplazo en ecuación de la recta y hallo la concentración (x) en $\mu\text{g/mL}$:

$$\frac{(24.284.895 + 3.000.000)}{2.000.000} = x$$

$$x = 13,64 \mu\text{g/mL}$$

2. Relaciono esos microgramos por cada mililitro hallado ($13,64 \mu\text{g/mL}$), con los microgramos que habría en los 25 mL del matraz. (Recordar que previo a filtrar e inyectar en el HPLC, se hizo una dilución 1/10 en el matraz de 25 mL con 2,5 mL del sobrenadante):

$$\begin{array}{l} 1 \text{ ml} - - - - - 13,64 \mu\text{g} \\ 25 \text{ ml} - - - - - x = 341,06 \mu\text{g} \end{array}$$

3. Esos microgramos que están en 25 mL del matraz, son los que a su vez están en los 2,5 mL del sobrenadante. Por lo que sabiendo eso, se debería hallar los microgramos en los 14 mL iniciales (recordar que al pesar cada muestra, se la disolvió en 2,5 mL de metanol y se agregó 11,5 mL de agua destilada, siendo el volumen final de 14 mL):

$$\begin{array}{l} 2,5 \text{ ml} - - - - - 341,06 \mu\text{g} \\ 14 \text{ ml} - - - - - x = 1909,94 \mu\text{g} \end{array}$$

4. Por último, esos microgramos presentes en los 14 mL corresponden a los microgramos presentes en la masa pesada antes de disolverla en metanol y agua. Por lo que el cálculo final sería:

$$\frac{0,1010 \text{ g} - - - - - 1909,94 \mu\text{g}}{1000 \text{ g (1 kg)} - - - - - x} = 18910323,27 \mu\text{g} = 18,91 \text{ gr}$$

Es decir, en la primera inyección de la **muestra-a** en el HPLC, la misma contiene 18,91 gr de cumarina/kg de muestra.

6 DISCUSIÓN

En lo que respecta a la puesta a punto del método, se trabajó con una columna de C-18 de 15 cm, a diferencia de lo propuesto por Nava Álvarez *et al.* (2015), donde emplearon una de 25 cm. De igual modo, al ver los cromatogramas de las figuras 14 y 16 se puede apreciar una muy buena resolución de los mismos.

Antes de analizar los resultados de este trabajo, cabe aclarar que no se ha encontrado información sobre la/s especie/s de canela que se produce/n en Argentina, pero al no ser el lugar nativo de estos árboles, las condiciones de cultivo podrían estar influyendo de manera directa en la concentración de sus componentes y por lo tanto, no coincidir con los datos que se recolecten de la bibliografía.

Las concentraciones y porcentajes de cumarina obtenidos en cada muestra, fueron los siguientes:

- Muestra a: 18,45 g/kg → 1,84%
- Muestra b: 28,70 g/kg → 2,87%
- Muestra c: 14,41 g/kg → 1,44%

De estos resultados se puede decir que las canelas en forma de polvo (muestras a y b) presentaron un mayor contenido de cumarina que la presentación en rama (muestra c), contradiciéndose con lo hallado en la bibliografía. Algunas explicaciones para este hallazgo podrían ser que no se puede afirmar que las muestras de canela en polvo provengan de la misma especie de árbol que la canela en rama que se compara; por otro lado, tampoco se puede asegurar que las muestras en polvo no sean en realidad, una mezcla de distintas procedencias; y también se debe tener en cuenta que si las condiciones de cultivo del árbol del cual se obtuvo la rama fueron distintas a la de los árboles de los cuales se obtuvieron las muestras en polvo, eso también influiría en la concentración de cumarina.

Como las muestras analizadas son de producción Argentina, si se quisiera, no se podría comprar dichos resultados con los obtenidos por Wang *et al.* (2013). Ya que dichos investigadores trabajaron con muestras tanto auténticas como adquiridas en el comercio de Estados Unidos, sumado a que la técnica y método empleado en este trabajo difiere de la de ellos en varios aspectos. Por lo que ambas variables (origen de muestras y técnicas de análisis) influyen en la concentración de los componentes de la canela, haciendo que los resultados no puedan ser comparables.

Por lo que, se podría decir como conclusión de lo expuesto, que la determinación de los componentes de la canela, en este caso, de las cumarinas, depende de muchos factores que hay que tenerlos en cuenta a la hora de hacer un análisis certero.

7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método es el procedimiento para demostrar que el método analítico es aceptable para el fin que se pretende (Harris, 2006).

La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con el uso dado o la aplicación (Eurachem.org.).

En este trabajo se determinaron los siguientes atributos de validación:

Linealidad: es la capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

Intervalo lineal – rango: es la franja de concentraciones dentro de las cuales son aceptables la linealidad, exactitud y precisión.

Precisión: es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. Es la reproducibilidad de un resultado. Se deben realizar mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas. De acuerdo a las variaciones de estas “condiciones específicas” podemos determinar tres niveles de precisión:

- **Precisión entre ensayos o Repetibilidad:** se evalúa analizando alícuotas de un material homogéneo varias veces, por una misma persona, un mismo día y con el mismo equipo. Cada análisis es independiente.
- **Reproducibilidad o Precisión entre laboratorios:** es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios. Para ello se analizan alícuotas de la misma muestra por diferentes analistas en diferentes laboratorios y en fechas diferentes, usando equipos y reactivos de cada uno de los laboratorios.
- **Precisión Intermedia o Precisión dentro de un laboratorio:** su objetivo es obtener una estimación de la precisión que refleje todas las fuentes de variación que se producirán en un solo laboratorio en condiciones de rutina (diferentes analistas, diferentes días, etc.).

El número mínimo especificado de repeticiones varía con los diferentes protocolos, pero está típicamente entre 6 y 15 para cada material utilizado en el estudio.

Límite de detección (LOD): es la menor cantidad de analito que es significativamente distinto del blanco.

Límite de cuantificación (LOQ): es la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas. (Eurachem.org; Harris, 2006; Validación de métodos analíticos, 2002).

Resultados de la validación para los parámetros explicados:

Linealidad: en cuanto a la curva de calibración (Figura 15) obtenida luego de graficar Áreas bajo la curva vs. Concentración, se pudo observar que la relación entre ambas variables es de tipo lineal en el rango estudiado, con un coeficiente de correlación al cuadrado (R^2) de 0,9912. Por lo que al ser muy próximo a 1, indica que los datos se ajustan bastante bien a la recta de regresión lineal.

Intervalo lineal – rango: el intervalo lineal de concentraciones para la cumarina determinado en este trabajo, fue de 5,24 $\mu\text{g/mL}$ - 36,71 $\mu\text{g/mL}$.

Precisión: en este trabajo, se evaluó solamente la Precisión entre ensayos o Repetibilidad. Para ello se procesó por un mismo operador, una misma muestra (se eligió la **muestra a**), siendo ensayos independientes, en un mismo día y en el mismo equipo (HPLC). De esta muestra se hicieron 10 repeticiones.

Se obtuvieron resultados de Tiempo de Retención y Área bajo la curva. Éste último dato se usó para calcular la concentración de cumarina en cada repetición de la muestra, usando la ecuación de la curva de calibración (de la misma manera en la que se explicó en la sección 5.3) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de ensayos de repetibilidad

Repetición N°	Tiempo de retención (min)	Área bajo la curva	Concentración (g/kg)
1	2,483	20.567.257	16,33
2	2,46	20.420.961	16,23
3	2,447	20.530.560	16,31
4	2,44	20.178.763	16,06
5	2,437	20.198.771	16,08
6	2,433	20.474.120	16,27
7	2,433	20.591.685	16,35
8	2,43	20.287.213	16,14
9	2,423	20.012.793	15,95
10	2,42	20.667.378	16,40

De las concentraciones halladas, se obtuvo el promedio ($\bar{x} = 16,21 \text{ g/kg}$), el cual es un dato necesario para calcular la desviación estándar de las mediciones.

Desviación estándar de las concentraciones: $\sigma = 0,1405 \text{ g/kg}$

Coefficiente de variación: **CV = 0,87 %**

Con estos resultados se concluye que el método demostró ser muy preciso en cuanto a repetibilidad, ya que el coeficiente de variación demuestra que los resultados de las diferentes mediciones fueron muy homogéneos, presentando poca variabilidad.

Límite de detección (LOD):

Cálculo: $3 \times \sigma = 0,4214 \text{ g/kg}$

Límite de cuantificación (LOQ):

Cálculo: $10 \times \sigma = 1,4047 \text{ g/kg}$

Los límites de detección y cuantificación hallados se encuentran en unidades de g cumarina/kg muestra, y se deberían convertir a $\mu\text{g/mL}$ por ser las unidades de concentración de los patrones de la curva de calibración y así poder interpretarlo en dichas unidades y a través de la curva.

Para convertirlos en dichas unidades hay que realizar los cálculos teniendo en cuenta las diluciones y la masa inicial pesada (pero de manera inversa a como se explicó en la sección 5.3), que al tratarse de la **muestra a** (era la que se eligió para el ensayo de repetibilidad), era de 0,1010 gr.

Sabiendo eso y realizando los cálculos pertinentes, los límites serían:

LOD: 0,30 $\mu\text{g/mL}$

LOQ: 1,01 $\mu\text{g/mL}$

8 CONCLUSIÓN

A partir de la realización del trabajo se logró adquirir mayor destreza en prácticas de laboratorio y en técnicas instrumentales, como ser manejo de HPLC, para determinación de analitos (en este caso particular, de cumarinas) e interpretación y análisis de resultados.

Con respecto a los objetivos particulares de esta Práctica Electiva, se llevó a cabo la puesta a punto y la validación del método analítico para algunos parámetros, pero no se realizó su optimización por diseño experimental, por considerar que no se justificaba dicha práctica en este caso.

Finalmente, se logró poder aplicar el método en la cuantificación de cumarinas en muestras comerciales de canela y analizar sus resultados.

9 BIBLIOGRAFÍA

- (S/f-b). Eurachem.org. Recuperado el 23 de mayo de 2023, de https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
- Carretero Accame, M. E. (2009). Actividad terapéutica de la corteza de canela. *Panorama actual del medicamento*, 33(325), 733. <https://botplusweb.farmaceuticos.com/Documentos/2009/8/31/40074.pdf>
- *Código Alimentario Argentino*. (2018, mayo 7). Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Harris, D. C. (2006). *Análisis Químico Cuantitativo*. (3ª edición). Editorial Reverté.
- Lončar, M., Jakovljević, M., Šubarić, D., Pavlič, M., Buzjak Služek, V., Cindrić, I., & Molnar, M. (2020). Coumarins in food and methods of their determination. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(5), 645. <https://doi.org/10.3390/foods9050645>
- Muñoz Ezcurra, C. (2021). *Variabilidad de los parámetros de calidad de muestras comerciales de canela molida*. Universidad Miguel Hernández. <http://dspace.umh.es/handle/11000/25496>
- Nava Álvarez, R., Juárez Juárez, M., Bolaños Valerio, E., & Morales Jaimes, M. (2015). *Determinación de cumarinas con actividad antioxidante por cromatografía de líquidos de alta resolución*. <http://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/8792>
- Validación de métodos analíticos (2002). *Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico*. Anexo 3 informe 36. https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
- Wang, Y.-H., Avula, B., Nanayakkara, N. P. D., Zhao, J., & Khan, I. A. (2013). Cassia cinnamon as a source of coumarin in cinnamon-flavored food and food supplements in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18), 4470–4476. <https://doi.org/10.1021/jf4005862>