

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Diseño y validación de un método analítico para la  
cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos  
en forma de gomita que se comercializan en Guatemala**

Trabajo de graduación presentado por  
Evelyn Paola Girón Gramajo para optar al grado académico de  
Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala,

2025



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



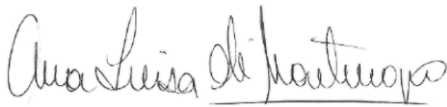
**Diseño y validación de un método analítico para la  
cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos  
en forma de gomita que se comercializan en Guatemala**

Trabajo de graduación presentado por  
Evelyn Paola Girón Gramajo para optar al grado académico de  
Licenciada en Química Farmacéutica

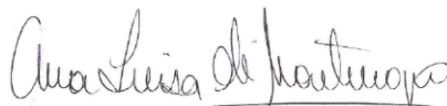
Guatemala,

2025


Vo. Bo. :

(f)   
\_\_\_\_\_  
Licenciada Ana Luisa Mendizábal Solé  
Asesor

Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Licenciada Ana Luisa Mendizábal Solé  
Asesora

  
(f) \_\_\_\_\_  
Licenciado Sergio Alejandro Sánchez Ramos

  
(f) \_\_\_\_\_  
Dr. Élfego Rolando López García  
Director  
Departamento de Química  
Farmacéutica

Fecha de aprobación: Guatemala, 24 de abril de 2025

## **Agradecimientos**

**A mis padres** por todo el sacrificio, esfuerzo, dedicación que pusieron durante toda mi carrera universitaria para que yo pudiera culminar esta etapa de mi vida de la mejor manera posible. Gracias por todo el amor, apoyo y comprensión que me brindaron cada semana, para alentarme siempre a seguir y alcanzar esta meta.

**A mis hermanos** por todo el cariño, apoyo y comprensión que me brindaron a lo largo de mi carrera universitaria, motivándome siempre a seguir y a culminar esta etapa de mi vida con éxito.

**A mis amigos de la universidad** por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de la carrera, ya que, a pesar de los momentos difíciles que afrontamos, ellos siempre pusieron todo su esfuerzo para hacer de mis días en la universidad los mejores. Cada momento será recordado con mucha nostalgia.

**A mi asesora Ana Luisa Mendizábal y a mi revisor Sergio Sánchez** por brindarme todo su apoyo, tiempo y conocimientos para poder culminar esta investigación con éxito.

**A la Universidad del Valle de Guatemala** por haberme brindado los conocimientos y herramientas necesarias a completar mi formación académica, abriéndome diversas puertas y oportunidades para adentrarme con éxito al ámbito laboral

# Índice

<b>Listado de figuras.....</b>	<b>xi</b>
<b>Listado de cuadros .....</b>	<b>xii</b>
<b>Listado de ecuaciones .....</b>	<b>xv</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>xvi</b>
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Marco conceptual.....</b>	<b>3</b>
A. Antecedentes del problema .....	3
B. Justificación .....	5
C. Planteamiento del problema.....	6
D. Alcance y limitantes del problema.....	6
1. Alcance.....	6
2. Limitantes.....	7
<b>III. Marco teórico.....</b>	<b>8</b>
A. Suplementos dietéticos.....	8
1. Consumo de suplementos dietéticos .....	8
2. Aspectos regulatorios para suplementos dietéticos .....	10
a. Estados Unidos .....	10
b. Guatemala.....	11
B. Melatonina .....	12
1. Propiedades físicas y químicas.....	12
2. Fisiología.....	13
3. Síntesis .....	15
4. Mecanismo de acción.....	16
5. Farmacocinética de la melatonina exógena.....	17
a. Absorción.....	17
b. Distribución .....	18

c.	Metabolismo .....	18
d.	Excreción .....	19
6.	Fuentes naturales de melatonina.....	19
7.	Usos terapéuticos actuales.....	20
a.	Resincronizador del ritmo circadiano y los ciclos vigilia-sueño .....	20
b.	Agente antioxidante .....	21
8.	Dosificación .....	22
9.	Efectos adversos e interacciones farmacológicas.....	22
C.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	24
1.	Principio .....	25
2.	Equipo .....	25
a.	Depósito de solvente.....	26
b.	Desgasificador .....	27
c.	Bomba.....	27
d.	Inyector.....	29
e.	Columnas .....	30
f.	Detector .....	31
g.	Dispositivo de recopilación de datos .....	32
D.	Validación de un método analítico .....	32
1.	Especificidad .....	32
2.	Linealidad.....	33
3.	Rango .....	33
4.	Exactitud.....	35
5.	Precisión .....	35
a.	Repetibilidad.....	36
b.	Precisión intermedia .....	37
c.	Reproducibilidad .....	37
6.	Límite de detección (LOD) .....	37
7.	Límite de cuantificación (LOQ).....	38

8. Robustez .....	38
<b>IV. Marco metodológico.....</b>	<b>40</b>
A. Objetivos .....	40
B. Hipótesis de investigación .....	40
C. Variables.....	41
D. Población.....	45
F. Procedimiento .....	46
1. Revisión bibliográfica .....	46
2. Elaboración del plan de trabajo.....	46
3. Revisión e integración de los aspectos fundamentales del trabajo.....	46
4. Experimentación y análisis de resultados.....	46
a. Preparación de soluciones de melatonina .....	46
1) Preparación solución madre de melatonina .....	47
2) Preparación soluciones estándar de melatonina.....	47
b. Preparación de las muestras de gomitas de melatonina.....	48
1) Preparación de muestras de gomitas sin fortificar .....	48
2) Preparación de muestras de gomitas fortificadas.....	49
c. Condiciones del cromatógrafo HPLC:.....	49
d. Cuantificación de melatonina en las muestras.....	49
G. Diseño de investigación .....	50
H. Análisis estadístico.....	50
<b>V. Marco operativo .....</b>	<b>53</b>
A. Recolección y tratamiento de los datos.....	53
B. Recursos .....	53
1. Recursos humanos.....	53
2. Recursos materiales.....	53
3. Reactivos .....	53
4. Equipo .....	54
<b>VI. Resultados .....</b>	<b>55</b>

A.	Parámetros de validación .....	55
B.	Cuantificación de melatonina en las muestras de gomitas.....	59
<b>VII.</b>	<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>60</b>
A.	Especificidad .....	60
B.	Linealidad.....	61
C.	Exactitud.....	61
D.	Precisión.....	62
E.	LOD y LOQ .....	63
F.	Robustez .....	64
G.	Cuantificación de melatonina en las muestras .....	64
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>66</b>
<b>IX.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>67</b>
<b>X.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>68</b>
<b>XI.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>73</b>
A.	Glosario.....	73
B.	Fichas técnicas de los equipos .....	75
C.	Datos originales .....	77
D.	Concentración experimental de las soluciones de melatonina.....	88
1.	Concentración experimental de las soluciones de melatonina .....	88
a.	Solución madre .....	88
b.	Soluciones estándar .....	89
2.	Evaluación de parámetros de validación.....	90
a.	Exactitud.....	90
b.	Precisión .....	91
1)	Repetibilidad.....	91
2)	Precisión intermedia.....	93
c.	Límite de detección (LOD).....	93
d.	Límite de cuantificación (LOQ) .....	94
3.	Cuantificación de melatonina en muestras de gomitas .....	94

a.	Concentración de melatonina de la muestra en balón de 100 mL .....	94
b.	Cantidad de melatonina de la muestra en balón de 100 mL .....	95
c.	Cantidad de melatonina en muestras de gomitas .....	96
	1) Cantidad real de melatonina que contiene cada gomita .....	96
	2) Porcentaje de recuperación de melatonina en ambas marcas de gomitas ....	97
E.	Análisis Estadístico .....	98
F.	Cromatogramas .....	104

## Listado de figuras

<b>Figura No. 1:</b> Distribución geográfica del mercado de suplementos dietéticos .....	9
<b>Figura No. 2:</b> Nivel de crecimiento del mercado de suplementos dietéticos en todo el mundo .....	9
<b>Figura No. 3:</b> Estructura química de la melatonina .....	13
<b>Figura No. 4:</b> Glándula pineal .....	14
<b>Figura No. 5:</b> Síntesis de la melatonina .....	16
<b>Figura No. 6:</b> Partes de un cromatógrafo HPLC.....	26
<b>Figura No. 7:</b> Bomba cuaternaria.....	28
<b>Figura No. 8:</b> Inyector automático.....	30
<b>Figura No. 9:</b> Funcionamiento del detector .....	31
<b>Figura No. 10:</b> Linealidad y rango de un método analítico .....	34
<b>Figura No. 11:</b> Linealidad del sistema de cuantificación de melatonina .....	56
<b>Figura No. 12:</b> Linealidad del sistema de cuantificación de melatonina utilizando la columna Eclipse Plus .....	90
<b>Figura No. 13:</b> Cromatograma de la solución estándar a 1.035 ppm .....	105
<b>Figura No. 14:</b> Cromatograma de la solución estándar a 25.875 ppm .....	105
<b>Figura No. 15:</b> Cromatograma de la solución estándar a 51.75 ppm .....	105
<b>Figura No. 16:</b> Cromatograma la solución estándar a 77.625 ppm .....	105
<b>Figura No. 17:</b> Cromatograma de la solución estándar a 103.5 ppm .....	106
<b>Figura No. 18:</b> Cromatograma de la solución blanco metanol/agua (50:50).....	106
<b>Figura No. 19:</b> Cromatograma de la solución estándar a 1.035 ppm .....	106
<b>Figura No. 20:</b> Cromatograma de la solución estándar a 25.875 ppm .....	106
<b>Figura No. 21:</b> Cromatograma de la solución estándar a 51.75 ppm .....	107
<b>Figura No. 22:</b> Cromatograma la solución estándar a 77.625 ppm .....	107
<b>Figura No. 23:</b> Cromatograma de la solución estándar a 103.5 ppm .....	107
<b>Figura No. 24:</b> Cromatograma de la solución blanco metanol/agua (50:50).....	107
<b>Figura No. 25:</b> Cromatograma de las muestras del lote 1.....	108
<b>Figura No. 26:</b> Cromatograma de las muestras del lote 2.....	108
<b>Figura No. 27:</b> Cromatograma de las muestras del lote 1.....	108
<b>Figura No. 28:</b> Cromatograma de las muestras del lote 2.....	108
<b>Figura No. 29:</b> Cromatograma de las muestras del lote 1.....	109
<b>Figura No. 30:</b> Cromatograma de las muestras del lote 2.....	109
<b>Figura No. 31:</b> Cromatograma de las muestras del lote 1.....	109
<b>Figura No. 32:</b> Cromatograma de las muestras del lote 2.....	109

## Listado de cuadros

<b>Cuadro No. 1:</b> Cantidad de melatonina presente en algunas plantas comestibles.....	20
<b>Cuadro No. 2:</b> Cantidad de melatonina presente en algunos alimentos de origen animal	20
<b>Cuadro No. 3:</b> Influencia de los fármacos y sustancias en la secreción de melatonina ...	24
<b>Cuadro No. 4:</b> Variables independientes del estudio .....	41
<b>Cuadro No. 5:</b> Variables dependientes del estudio .....	42
<b>Cuadro No. 6:</b> Resultados de la especificidad del método .....	55
<b>Cuadro No. 7:</b> Resultados de la linealidad del método .....	55
<b>Cuadro No. 8:</b> Resultados de la exactitud del método.....	56
<b>Cuadro No. 9:</b> Resultados de la repetibilidad del método .....	57
<b>Cuadro No. 10:</b> Resultados de la precisión intermedia del método .....	57
<b>Cuadro No. 11:</b> Resultados del LOD y LOQ del método.....	58
<b>Cuadro No. 12:</b> Resultados de la robustez del método.....	58
<b>Cuadro No. 13:</b> Resultados de la cuantificación de melatonina en gomitas.....	59
<b>Cuadro No. 14:</b> Especificaciones de la balanza analítica .....	75
<b>Cuadro No. 15:</b> Especificaciones del cromatógrafo Agilent Series modelo 1100.....	76
<b>Cuadro No. 16:</b> Especificaciones de la columna Hypersil ODS .....	76
<b>Cuadro No. 17:</b> Especificaciones de la columna Eclipse Plus .....	77
<b>Cuadro No. 18:</b> Cantidad de melatonina por gomita de las marcas utilizadas para este estudio.....	77
<b>Cuadro No. 19:</b> Cantidad pesada de melatonina para la preparación de la solución madre .....	77
<b>Cuadro No. 20:</b> Peso individual de 10 gomitas de melatonina de ambos lotes de la marca A y B .....	78
<b>Cuadro No. 21:</b> Cantidad necesaria de cada gomita de melatonina para la preparación de las soluciones a 50 ppm. ....	78
<b>Cuadro No. 22:</b> Cantidad pesada de las gomitas de melatonina para la preparación de las soluciones en triplicado a 50 ppm.....	79
<b>Cuadro No. 23:</b> Cantidad pesada de las gomitas de melatonina para la preparación de las soluciones fortificadas en triplicado a 100 ppm .....	79
<b>Cuadro No. 24:</b> Cantidad pesada de melatonina para la preparación de las soluciones fortificadas en triplicado a 100 ppm .....	80
<b>Cuadro No. 25:</b> Datos obtenidos de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar de melatonina, utilizando la columna Hypersil ODS .....	80
<b>Cuadro No. 26:</b> Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Hypersil ODS ..	81

<b>Cuadro No. 27:</b> Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar en el día 2, utilizando la columna Hypersil ODS.....	82
<b>Cuadro No. 28:</b> Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las muestras .....	83
<b>Cuadro No. 29:</b> Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las muestras fortificadas .....	83
<b>Cuadro No. 30:</b> Datos obtenidos de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Hypersil ODS .....	84
<b>Cuadro No. 31:</b> Datos obtenidos de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar de melatonina utilizando la columna Eclipse Plus .....	85
<b>Cuadro No. 32:</b> Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Eclipse Plus .....	86
<b>Cuadro No. 33:</b> Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Eclipse Plus .....	87
<b>Cuadro No. 34:</b> Datos obtenidos de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Eclipse Plus.....	87
<b>Cuadro No. 35:</b> Concentración experimental de las soluciones estándar de melatonina .	89
<b>Cuadro No. 36:</b> Resultados de los porcentajes de recuperación (%R) .....	91
<b>Cuadro No. 37:</b> Resultados de las desviaciones estándar de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 1 .....	91
<b>Cuadro No. 38:</b> Resultados de los coeficientes de variación (%CV) de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 1 .....	92
<b>Cuadro No. 39:</b> Resultados de las desviaciones estándar de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 2.....	93
<b>Cuadro No. 40:</b> Resultados de los coeficientes de variación (%CV) de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 2.....	93
<b>Cuadro No. 41:</b> Resultados del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ) utilizando la solución blanco.....	94
<b>Cuadro No. 42:</b> Resultados de la concentración de melatonina de la muestra en balón de 100 mL .....	95
<b>Cuadro No. 43:</b> Resultados de la cantidad de melatonina de la muestra en balón de 100 mL .....	96
<b>Cuadro No. 44:</b> Resultados de la cantidad real de melatonina en cada muestra .....	96
<b>Cuadro No. 45:</b> Resultados de los porcentajes de recuperación (%R) de melatonina en ambas marcas de gomitas.....	97
<b>Cuadro No. 46:</b> Estadística descriptiva del peso individual de 10 gomitas de melatonina para ambos lotes de la marca A y B .....	98
<b>Cuadro No. 47:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar, utilizando la columna Hypersil ODS .....	98

<b>Cuadro No. 48:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Hypersil ODS.....	99
<b>Cuadro No. 49:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Hypersil ODS.....	99
<b>Cuadro No. 50:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las muestras ....	100
<b>Cuadro No. 51:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las muestras fortificadas .....	100
<b>Cuadro No. 52:</b> Estadística descriptiva de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Hypersil ODS .....	101
<b>Cuadro No. 53:</b> Tabla ANOVA de la curva de calibración utilizando la columna Hypersil ODS.....	101
<b>Cuadro No. 54:</b> Estadística descriptiva de la cantidad de melatonina encontrada en las muestras de gomitas de la marca A y B .....	102
<b>Cuadro No. 55:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar utilizando la columna Eclipse Plus .....	102
<b>Cuadro No. 56:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Eclipse Plus.....	103
<b>Cuadro No. 57:</b> Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Eclipse Plus.....	103
<b>Cuadro No. 58:</b> Estadística descriptiva de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Eclipse Plus.....	104
<b>Cuadro No. 59:</b> Tabla ANOVA de la curva de calibración utilizando la columna Eclipse Plus.....	104

## Listado de ecuaciones

<b>Ecuación No. 1:</b> Curva de calibración .....	33
<b>Ecuación No. 2:</b> Porcentaje de recuperación (%R).....	35
<b>Ecuación No. 3:</b> Desviación estándar ( $\sigma$ ) .....	36
<b>Ecuación No. 4:</b> Coeficiente de variación (%CV).....	36
<b>Ecuación No. 5:</b> Límite de detección (LOD).....	37
<b>Ecuación No. 6:</b> Límite de cuantificación (LOQ).....	38
<b>Ecuación No. 7:</b> Dilución.....	47

## **Resumen**

La melatonina ha sido clasificada como un suplemento dietético y puede encontrarse en distintas presentaciones para ser administrada por distintas vías, aunque estrictamente no ha sido regulada para su comercialización.

Con base en la información disponible y no restringida, se decidió llevar a cabo el presente estudio, cuyo propósito consistió en diseñar y validar un método basado en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita comercializados en Guatemala. Además, se planteó como hipótesis de investigación que dicho método constituye una herramienta analítica adecuada para la cuantificación de melatonina en este tipo de suplementos.

Para ello, se procedió a evaluar los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección, límite de cuantificación y robustez del método, así como la cuantificación de melatonina en estos suplementos. Los resultados obtenidos de la cuantificación se compararon con la cantidad de melatonina declarada en su etiqueta nutricional, mostrando una mayor cantidad de melatonina por gomita en la marca A y una menor cantidad en la marca B. Sin embargo, estas cantidades no superaron los límites permitidos de principio activo según la USP, por lo que ambas marcas cumplieron con las cantidades adecuadas de melatonina para su comercialización.

Para ampliar y complementar el presente estudio, se recomienda utilizar el método diseñado como referencia para futuras investigaciones que incluyan otro tipo de gomitas, a manera de corroborar su utilidad práctica en distintas matrices.

## I. Introducción

La melatonina es una hormona que se descubrió en 1917 por McCord y Allen, quienes, al alimentar a renacuajos con un extracto de la glándula pineal de bovinos, pudieron observar la aparición de manchas oscuras en la piel de estos animales, debiéndose principalmente a la contracción de los melanóforos (célula que contiene melanina). A partir de este descubrimiento, se creía que la melatonina tenía cierto efecto en la agregación de gránulos de melanina, lo cual le confería cierto cambio de coloración. Por esta razón, incluso se propuso su utilidad para el tratamiento del vitíligo (Saavedra et al., 2021).

En 1958, Aaron B. Lerner junto con colaboradores de la Universidad de Yale, aislaron la melatonina y describieron su estructura química como N-acetil-5-metoxitriptamina. Para 1970, se descubrió su función en la regulación del ritmo circadiano y los estados de sueño-vigilia, por lo que la mayoría de estudios desarrollados hasta la actualidad se han enfocado en dicha función. Posteriormente, en 1993 se reportaron sus efectos antioxidantes por lo que desde entonces se ha postulado como un posible tratamiento futuro para tratar distintas patologías, entre las cuales destacan: la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas como el cáncer, las dislipidemias y las enfermedades cardiovasculares. En la actualidad la melatonina se utiliza principalmente como agente antioxidante y para el tratamiento del insomnio, así como la resincronización del ritmo circadiano y el ciclo vigilia-sueño (Saavedra et al., 2021).

La melatonina ha sido clasificada como un suplemento dietético, denominación que se le da a aquellos productos que cuentan con una fuente concentrada de macro y micronutrientes, sustancias bioactivas, enzimas o probióticos, en forma aislada o combinada, con el fin de ser suplementos que brinden un efecto nutricional o fisiológico para complementar la dieta habitual de una persona. Estos productos se encuentran en distintas presentaciones para ser administrados por distintas vías, sin embargo, se han clasificado como alimentos y no como medicamentos por la Administración de Alimentos

y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), lo cual significa que estos no se encuentren estrictamente regulados antes de ser comercializados (Wierzejska, 2021).

Los suplementos dietéticos se encuentran disponibles en lugares de venta libre como supermercados y farmacias, y se comercializan en distintas presentaciones, como: tabletas, cápsulas blandas, cápsulas de gel, gomitas (también conocidas como geles masticables), polvos, bebidas, barras o cualquier otra forma en la que estos productos puedan ingerirse en dosis medidas. Por esta razón, muchas veces el etiquetado o publicidad de estos productos contiene afirmaciones erróneas respecto al contenido o las cantidades de ingredientes declarados en sus etiquetas, siendo muchas veces alterados con sustancias ajenas y pudiendo ser perjudiciales para los consumidores (Djaoudene et al., 2023).

Mediante el presente estudio se diseñó y validó el método analítico de cromatografía HPLC para evaluar los suplementos dietéticos en forma de gomita, ya que estos productos se han convertido en una de las alternativas más utilizadas en los últimos años respecto a las formas tradicionales de administración oral (comprimidos, cápsulas blandas y duras). Además, son una forma de dosificación más atractiva para el consumidor debido a que les brinda la sensación de estar comiendo un dulce o caramelo, siendo de esta manera más amigable con el paladar, especialmente entre la población pediátrica y geriátrica (Sabri et al., 2022).

Dado que hasta la fecha no se han desarrollado muchos estudios a nivel mundial que evalúen la cantidad de melatonina en esta presentación, y ninguno en Guatemala mediante cromatografía HPLC, este estudio tuvo como objetivo cuantificar la cantidad de este principio activo en estos suplementos para corroborar si efectivamente cumplen con lo declarado en la etiqueta nutricional y que no representan un posible riesgo para la población guatemalteca.

## **II. Marco conceptual**

### **A. Antecedentes del problema**

Según el Acta de 1994 de la Educación de Salud de Suplementos Dietéticos (DSHEA por sus siglas en inglés), los fabricantes y distribuidores de ingredientes y suplementos dietéticos tienen prohibido comercializar productos que se encuentren adulterados o mal etiquetados. Por ende, las empresas poseen la responsabilidad de evaluar la seguridad de sus productos previo a que estos se comercialicen en el mercado. Además, deben velar por que el etiquetado de sus productos cumpla con las especificaciones pertinentes y con todos los requisitos aplicables por la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos modificada por la DSHEA, y las regulaciones de la FDA. Asimismo, la FDA posee la autoridad para tomar medidas ante la detección de cualquier suplemento dietético adulterado o mal etiquetado una vez este se encuentre disponible en el mercado (FDA, 2024).

Asimismo, la FDA establece en el capítulo <2750> las prácticas de fabricación de suplementos dietéticos, detallando los requisitos que deben cumplir las empresas responsables de estos productos, así como las normas adicionales para garantizar su calidad, según lo indicado por la USP-NF. Este capítulo abarca el proceso, las instalaciones y los controles necesarios para el envasado, etiquetado, almacenamiento y distribución de suplementos dietéticos, con base en las buenas prácticas vigentes. El objetivo es asegurar que los fabricantes mantengan estándares de calidad en la producción y supervisen regularmente los suplementos para su uso previsto (FDA, 2024).

Debido a que los suplementos dietéticos en forma de gomita son una forma de dosificación relativamente reciente, en la actualidad únicamente se han llevado a cabo pocos estudios en los que se evalúa la calidad de los mismos (Cohen et al., 2023). Erland & Saxena en 2017 analizaron 30 suplementos de melatonina de diferentes marcas y presentaciones, con el fin de evaluar una posible presencia de serotonina y la variabilidad en el contenido de melatonina respecto a lo declarado en la etiqueta de cada producto. Para

la cuantificación de melatonina y serotonina se utilizó cromatografía HPLC con detección electroquímica y para confirmar la presencia de serotonina se utilizó cromatografía HPLC con detección por espectrometría de masas. Tras el análisis se encontró que el contenido de melatonina presente en los productos oscilaba entre el -83% y el +478 % de la cantidad declarada en la etiqueta. Además, la variabilidad entre lotes oscilaba hasta en un 465%. Por otra parte, se identificó la presencia de serotonina en 8 de los suplementos analizados, en cantidades de 1 hasta 75 µg (Erland & Saxena, 2017).

De manera similar, en 2023 Cohen et al. evaluaron la cantidad de melatonina y cannabidiol (CBD) en gomitas de melatonina vendidas en Estados Unidos, siendo este el primer estudio de su clase en dicho país. Para dicho estudio, se analizaron 25 marcas de gomitas de melatonina mediante Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión (UHPLC), las cuales se reconstituyeron inicialmente en metanol y una mezcla acuosa de acetonitrilo-metanol y posteriormente se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución con matriz de fotodiodos. De los productos analizados, 5 declararon el CBD como ingrediente y su cantidad oscilaba entre 104% y 118% de la cantidad indicada en la etiqueta. Asimismo, una de las marcas analizadas contenía niveles detectables de melatonina, pero, a su vez, también contenía CBD (el cual no se encontraba declarado en la etiqueta). En los productos restantes, la cantidad de melatonina detectada variaba respecto a la cantidad real presente en los productos, oscilando entre el 74% y el 347% de la cantidad declarada en la etiqueta nutricional. Además, 22 de los 25 productos analizados (88%) se encontraban etiquetados incorrectamente y únicamente 3 de los productos (12%) contenían una cantidad de melatonina aceptable (que se encontraba dentro del  $\pm 10\%$ ) de la cantidad declarada (Cohen et al., 2023).

En 2005 Salazar desarrolló el único estudio de su clase en Guatemala para evaluar la calidad en distintos suplementos dietéticos de melatonina, pero únicamente en forma de tableta o comprimido, con y sin recubrimiento. Por lo tanto, aún no se ha llevado a cabo ningún estudio en el que se evalúe la calidad de los suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita en el país, y, por ende, no se ha evaluado si estos productos realmente cuentan con la cantidad de melatonina declarada en sus etiquetas.

## **B. Justificación**

De acuerdo a las características farmacológicas de la melatonina, esta se ha convertido en una de las alternativas más utilizadas para inducir el sueño, ejerciendo una función reguladora en la sincronización interna de los ritmos biológicos. La suplementación con melatonina se ha encargado de reforzar el ciclo fisiológico de sueño y de mediar las fases del ciclo circadiano, pero el atractivo que ha adquirido la melatonina se debe principalmente a su asociación con la "naturalidad" en comparación con otros somníferos farmacológicos. Sin embargo, no se puede deducir el verdadero perfil de seguridad de estos productos, ya que muchos de estos se comercializan ilegalmente o no cuentan con los registros sanitarios necesarios debido a la falta de supervisión regulatoria, conllevando a que haya una amplia disponibilidad en el mercado sin saber realmente si estos productos cuentan con la cantidad de ingredientes declarados en sus etiquetas (Lee et al., 2023).

Debido a que la melatonina es considerada un suplemento dietético, esta corresponde a un producto de venta libre que se comercializa en distintas formas, como: tabletas orales de liberación inmediata y prolongada, formulaciones líquidas y gomitas (también conocidas como geles masticables). Las dosis recomendadas de melatonina varían entre un rango amplio, pudiendo ser de 0.1 mg hasta más de 20 mg, pero se desconoce la dosis óptima para los distintos usos que se le atribuyen. Sin embargo, las dosis típicas se encuentran entre 1 y 5 mg (Givler et al., 2023).

Los suplementos dietéticos en forma de gomitas han adquirido gran popularidad en el mercado debido a que le brindan al consumidor una apariencia de dulce o caramelo, resultando atractivo para los consumidores de todas las edades. Sin embargo, los productos de melatonina no se encuentran regulados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA), por lo que se comercializan sin receta como suplementos dietéticos o alimentos (Cohen et al., 2023).

Debido a que la FDA no regula la melatonina, las formulaciones que se encuentran disponibles comercialmente pueden incluso encontrarse adulteradas. Se ha demostrado que el contenido de melatonina en las formulaciones comercializadas en Estados Unidos, el cual corresponde a un país de suministro popular para Guatemala, varía entre el 17% y el

478% de las cantidades de melatonina que se encuentran indicadas en las etiquetas de los productos (Lee et al., 2023). Asimismo, a pesar de que en Guatemala únicamente existen dos marcas comerciales registradas actualmente, no se ha llevado a cabo algún estudio que evalúe y corrobore que la cantidad de melatonina en estos productos corresponde a la cantidad indicada en sus etiquetas nutricionales. Por ende, esto podría conllevar a un posible riesgo en la salud y seguridad del consumidor, ya que existe cada vez una mayor ingesta de productos de melatonina entre la población.

Mediante este estudio se diseñó y validó el método de cromatografía HPLC para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala, ya que esta novedosa forma de dosificación ha adquirido gran popularidad en los últimos años. Dicha popularidad se debe principalmente a su atractiva apariencia y sabor, pero esto también ha conllevado al aumento de la preocupación de seguridad debido a los estudios previamente mencionados. Por su parte, la cromatografía HPLC es uno de los métodos más utilizados para la identificación y cuantificación del ingrediente activo presente en una muestra de análisis, por lo que puede brindar resultados precisos para la evaluación de la calidad de estos productos y corroborar si estos cuentan con la cantidad de melatonina declarada en la etiqueta nutricional.

### **C. Planteamiento del problema**

¿El método por cromatografía HPLC corresponde a un método válido y reproducible para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala?

### **D. Alcance y limitantes del problema**

#### **1. Alcance**

Generar información científica mediante el diseño y validación de una metodología analítica confiable y robusta para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos

en forma de gomita. Para ello, se validó el método de cromatografía HPLC para el análisis de este principio activo en dichos suplementos, ya que actualmente se carece de estudios llevados a cabo en gomitas de melatonina. Como resultado de dicho análisis, se busca impactar positivamente en la Salud Pública, a través de la detección de las marcas de gomitas de melatonina que no cumplen con la concentración de melatonina declarada en su etiqueta nutricional, brindando así información transparente y verificable al consumidor sobre la calidad de estos productos.

## **2. Limitantes**

En este estudio no se evaluaron las características farmacocinéticas y farmacológicas de los suplementos, así como los aspectos de seguridad tras su ingestión. Tampoco se evaluaron aspectos como la calidad física o química de estos suplementos dietéticos. Respecto al método, en este estudio no se evaluó el parámetro de reproducibilidad.

### **III. Marco teórico**

#### **A. Suplementos dietéticos**

##### **1. Consumo de suplementos dietéticos**

Durante los últimos 20 años, el uso de suplementos dietéticos ha aumentado considerablemente en distintos países alrededor del mundo, dando lugar a que cada vez haya más productos, marcas y formulaciones disponibles en el mercado, las cuales se distribuyen a través de una amplia variedad de canales de comercialización. En 2021, se estimó que el valor del mercado mundial de suplementos dietéticos ascendería a aproximadamente 152 mil millones de dólares y se espera que alcance los 300 mil millones de dólares para el año 2028. Asimismo, el mercado global actual de los suplementos dietéticos se caracteriza por su constante aumento en ventas, lo cual evidencia que se han convertido en un complemento importante de la dieta de las personas alrededor del mundo (Djaoudene et al., 2023).

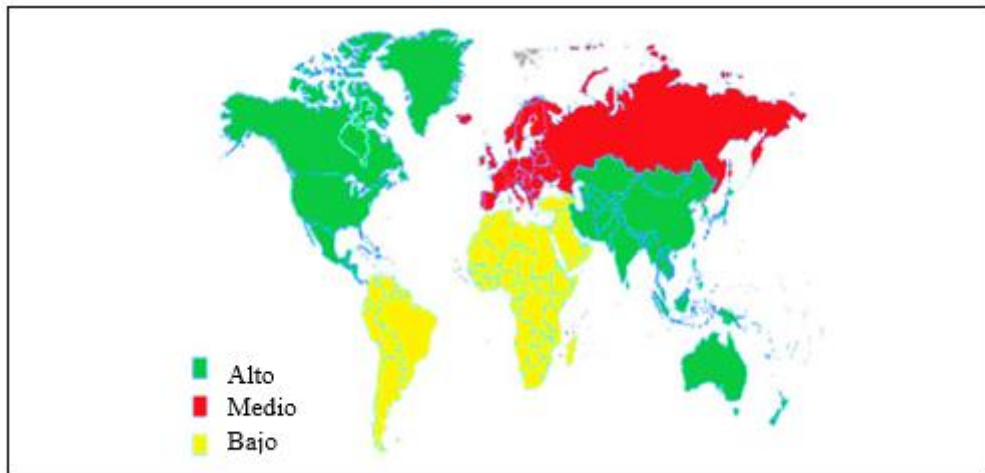
Debido a la creciente demanda, las investigaciones relacionadas con este campo también han aumentado, ya que actualmente pueden encontrarse más de 69.000 artículos sobre suplementos dietéticos publicados a través de PubMed entre el 2012 y el 2022. Asimismo, las ventas de suplementos dietéticos aumentaron drásticamente durante el año 2020 debido a la pandemia de COVID-19 en aproximadamente un 50% entre el 2018 y el 2020, superando así los 220 mil millones de dólares para este año (Djaoudene et al., 2023).

A medida que el mercado de los suplementos dietéticos ha ido en aumento, también existe una mayor preocupación por la calidad de los mismos. Por lo tanto, es necesario exigir estándares de calidad globales y prestar mayor atención a las regulaciones vigentes, ya que los productos adulterados o mal etiquetados pueden conllevar a un aumento en la aparición de efectos adversos (Djaoudene et al., 2023).

A diferencia de los productos farmacéuticos, los suplementos dietéticos actualmente se encuentran poco regulados, y existe poco acuerdo entre los países respecto al alcance

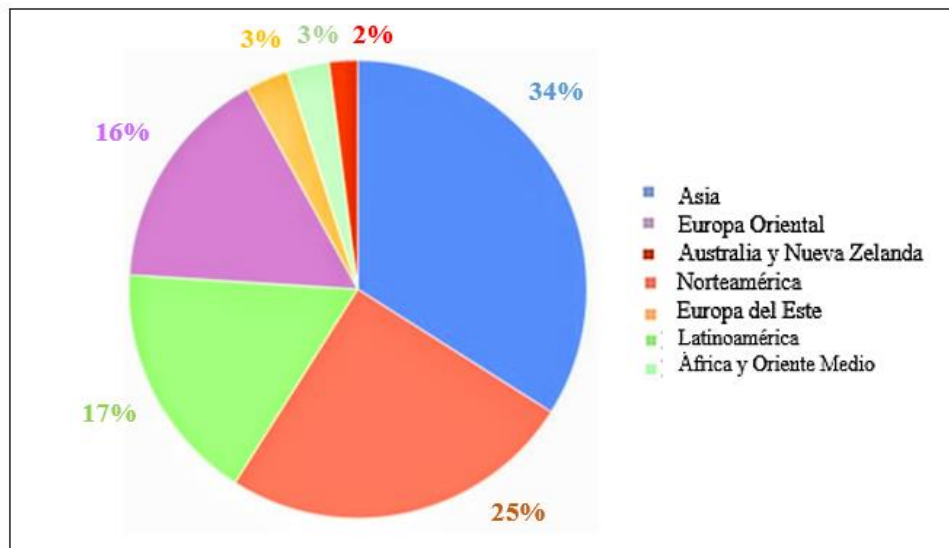
que pueden tener estos productos, los requisitos regulatorios que deberían tener, la definición, o incluso, la terminología que puede utilizarse para clasificarlos. Asimismo, la mayor preocupación respecto al uso de estos productos se debe principalmente a que no hay datos suficientes para respaldar su uso generalizado (Djaoudene et al., 2023).

**Figura No. 1:** Distribución geográfica del mercado de suplementos dietéticos



(Djaoudene et al., 2023).

**Figura No. 2:** Nivel de crecimiento del mercado de suplementos dietéticos en todo el mundo



(Djaoudene et al., 2023).

## **2. Aspectos regulatorios para suplementos dietéticos**

### **a. Estados Unidos**

La Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FD&C) se modificó en 1994 por la Ley de Salud y Educación sobre Suplementos Dietéticos (DSHEA), la cual se encargó de definir el término "suplemento dietético". Según la legislación vigente, la FDA no posee autoridad sobre los suplementos dietéticos para aprobar su seguridad y eficacia, incluyendo con ello la evaluación de su etiquetado previo a que estos se comercialicen en el mercado. Además, según la Ley FD&C, las empresas de suplementos dietéticos deben adquirir la responsabilidad de garantizar que sus productos no infrinjan la ley y cumplan las normas de seguridad designadas para los suplementos dietéticos (FDA, 2022).

Las etiquetas de los suplementos dietéticos deben incluir toda la información pertinente respecto a la información nutricional, la cual debe incluir: el tamaño de la porción, la cantidad de porciones por envase y una lista de todos los ingredientes dietéticos que contiene el producto con sus respectivas cantidades por porción. Asimismo, las etiquetas deben incluir en la parte delantera una declaración del producto que lo identifique como un "suplemento dietético". De lo contrario, se debe incluir un término descriptivo similar como: "suplemento de hierro" o "suplemento herbal" (FDA, 2022).

Sin embargo, a pesar que la FDA no se encarga de aprobar los suplementos dietéticos, esta sí participa en su regulación. Por ende, las empresas no pueden comercializar un suplemento dietético sin notificarlo previamente a la FDA, ya que la regulación comienza una vez estos se encuentran en el mercado. La regulación por parte de la FDA consiste en inspeccionar periódicamente las instalaciones de fabricación de suplementos dietéticos, a manera de corroborar que estas cumplan con los requisitos de fabricación y etiquetado aplicables. Asimismo, la FDA también se encarga de revisar la información presente en las etiquetas de los productos y los sitios web de las empresas, a manera de garantizar que los productos estén etiquetados correctamente y que no incluyan afirmaciones que puedan convertirlos en medicamentos (FDA, 2022).

La FDA también se encarga de supervisar periódicamente los informes de efectos adversos presentados por las empresas, los profesionales de la salud y los consumidores, así como otro tipo de quejas que involucren a los suplementos dietéticos, a manera de obtener información respecto a la seguridad de los productos una vez se encuentren en el mercado. Si la FDA descubre que un producto infringe la ley, esta puede: trabajar conjuntamente con la empresa para que este cumpla, pedirle a la empresa que lo retire voluntariamente del mercado o tomar medidas alternativas para retirarlo (FDA, 2022).

## **b. Guatemala**

La Norma Técnica 14 Versión 02-2022: *Norma Técnica para la evaluación y obtención de registro sanitario de suplementos alimenticios y complementos alimenticios para la población a partir de los tres años de edad, en el departamento de regulación y control de alimentos*, fue aprobada en 2022 por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala (MSPAS) y entró en vigencia el 24 de septiembre del mismo año (MSPAS, 2022).

Esta Norma Técnica tiene como objetivo establecer las condiciones y requisitos óptimos para la obtención del registro sanitario de un suplemento dietético, así como su posterior vigilancia cuando este se comercialice en el mercado. Por ende, mediante esta Norma Técnica se establecen las condiciones y los requisitos necesarios para la obtención del registro sanitario en Guatemala, incluyendo aquellos suplementos alimenticios que son importados por personas físicas o jurídicas, y excluyendo todos aquellos productos que son clasificados como medicamentos, productos homeopáticos, herbolarios, botánicos y cualquier otro producto declare excipientes en su formulación (MSPAS, 2022).

Entre los requisitos necesarios que deben presentarse para solicitar el registro sanitario de un suplemento dietético en el país, se encuentra la fórmula cualitativa y cuantitativa del producto y su respectiva Ficha Técnica, en la cual debe indicarse detalladamente el nombre, contenido neto, listado de ingredientes, uso destinado, características nutricionales aplicables, vida útil y condiciones de almacenamiento que deben tomarse en cuenta. De igual forma, debe presentarse un expediente del producto y una cantidad de muestras

establecidas por el Laboratorio Nacional de Salud (LNS), con su respectivo número de lote y fecha de caducidad (MSPAS, 2022).

El registro sanitario de los suplementos dietéticos en Guatemala establece una vigencia de 5 años, donde, para otorgarlo, el producto debe cumplir con los requisitos aplicables para su etiquetado. En estas se deben especificar las advertencias e instrucciones necesarias para su consumo y no debe contener afirmaciones que hagan alusión a que el producto cuenta con propiedades terapéuticas. Por otra parte, entre los requisitos necesarios para solicitar el registro sanitario de un suplemento dietético se incluyen: la boleta de pago por derecho de trámite, el etiquetado primario y secundario con los requerimientos aplicables en cada caso y el Certificado de Libre Venta (CLV), o, en caso que no haya CLV o algún equivalente, el Certificado de Buenas Prácticas de Manufactura (MSPAS, 2022).

Entre los criterios establecidos para evaluar los rangos permisibles de nutrientes presentes en los suplementos dietéticos se encuentran los siguientes:

- 1) El mínimo de contenido de los nutrientes debe corresponder al 20% de la dosis diaria recomendada, por lo que, si esto no cumple, no debe declararse en la etiqueta.
- 2) El máximo contenido de nutrientes presente en un suplemento dietético debe establecerse de acuerdo al valor de ingesta máxima tolerable (UL), ingesta máxima observada (HOI) o el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) respectivo.

(MSPAS, 2022)

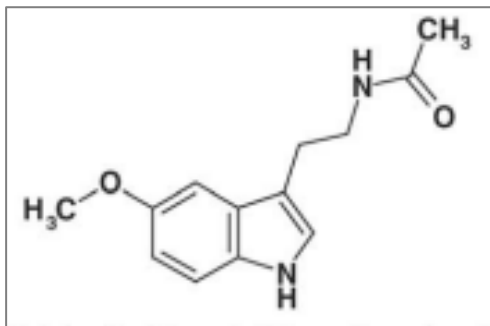
## **B. Melatonina**

### **1. Propiedades físicas y químicas**

La melatonina, o N-acetil-5-metoxi-triptamina, corresponde a una indolamina con un peso molecular de 278 kDa que es producida principalmente por la glándula pineal durante la noche. Esta secreción nocturna se basa en la actividad de un reloj circadiano que se encuentra localizado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, donde la luz

corresponde al principal factor que inhibe su síntesis. Esta inhibición puede ser total o parcial dependiendo si la persona se expone a demasiada luz durante la noche (Pin et al., 2014). Además, al ser una indolamina, la melatonina cuenta con características lipofílicas e hidrofílicas, por lo que cuenta con la capacidad de atravesar las barreras corporales fácilmente, pudiendo así atravesar la barrera hematoencefálica y permitiendo con ello su acción sobre los receptores de membrana, citoplasmáticos y nucleares (Saavedra et al., 2021).

**Figura No. 3:** Estructura química de la melatonina

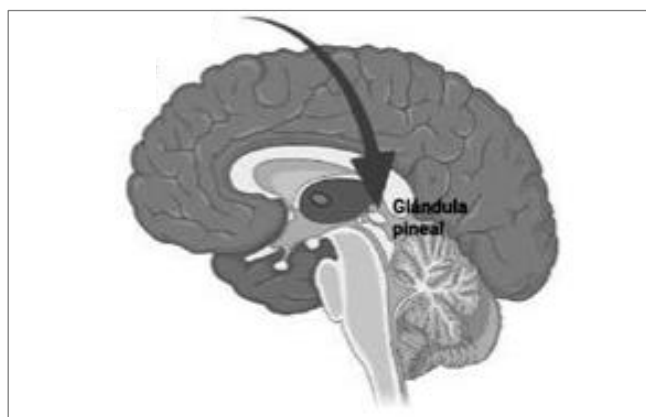


(Hardeland et al., 2006).

## 2. Fisiología

La glándula pineal se encuentra en el centro del cerebro, específicamente detrás del tercer ventrículo. Aquí los pinealocitos (principales células de la glándula pineal) son los encargados de producir indolaminas (melatonina) y péptidos vasoactivos. La producción y secreción de melatonina se encuentra estimulada por distintas fibras del nervio postgangliónico que se encuentra en la retina, donde esta hace un recorrido por el tracto retinohipotalámico hacia el núcleo supraquiasmático y el ganglio cervical superior respectivamente, y llega finalmente a la glándula pineal. Este sistema neuronal se ve estimulado por la falta de luz, por lo que se inactiva con la presencia de esta (Illnait, 2012).

**Figura No. 4:** Glándula pineal



(Saavedra et al., 2021).

La iluminación ambiental posee un efecto significativo en el ritmo de la síntesis de melatonina, donde la duración de su pico de secreción se correlaciona con la duración de la noche. El ritmo circadiano de la secreción de melatonina es controlado por un marcapaso endógeno que se encuentra en el núcleo supraquiasmático, donde la presencia de luz ambiental ocasiona que este sea más lento (Illnait, 2012). La síntesis de melatonina comienza durante la noche, principalmente entre las 20:00 y las 22:00 horas y alcanza una concentración plasmática máxima de 100 y 200 pg/ml entre las 24:00 y las 4:00 de la madrugada. Posteriormente, esta disminuye gradualmente durante el resto del periodo de oscuridad, llegando a ser mínima durante el día con una concentración plasmática de 10 y 30 pg/ml (Poza et al., 2018).

El efecto sincronizador con la luz comienza en la etapa fetal y oscila dependiendo de los niveles de la melatonina materna, variando respecto a la hora del día en la que se haga la exposición y respecto a la intensidad, duración y longitud de onda de la luz. El espectro de luz es especialmente importante, ya que las células ganglionares que se encuentran en la retina contienen melanopsina, la cual corresponde a un fotorreceptor que es sensible a la luz e influye en el correcto funcionamiento del ritmo circadiano (Poza et al., 2018).

Durante la niñez, la producción de melatonina inicia entre los 3 y 4 meses de edad, donde la glándula pineal inicia segregando poca melatonina. La producción de melatonina se va incrementando a lo largo de la infancia, alcanzando un pico máximo entre los 8 y 10

años de edad. Posteriormente, la concentración de melatonina disminuye conforme la persona envejece, por lo que, a partir de la pubertad, la síntesis se reduce de forma brusca. Pasados los 40-45 años esta disminuye paulatinamente y en mayores de 70 años los niveles de melatonina ya no son capaces de superar ni el 10% de la producción que se genera durante la infancia (Poza et al., 2018).

### **3. Síntesis**

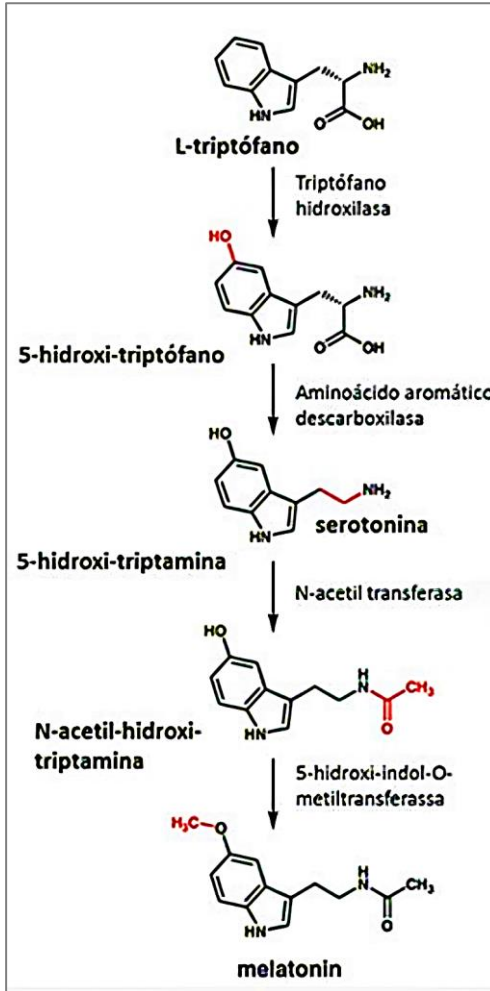
Hasta mediados de los años setenta se consideraba a la melatonina como una hormona que se producía únicamente en la glándula pineal. Sin embargo, actualmente se tiene conocimiento de que esta se sintetiza en diversos órganos extrapineales y no endocrinos, como: la glándula harderiana, la piel, la médula ósea, la retina, las células del tracto gastrointestinal productoras de serotonina, el cerebelo y el sistema inmunitario. Tanto la síntesis como la secreción de melatonina se encuentran reguladas por el núcleo supraquiasmático (NSQ). Del mismo modo, la melatonina se encarga de modular el NSQ y los relojes periféricos que se encuentran repartidos por todo el cuerpo, convirtiéndola en un marcador del ritmo circadiano (Poza et al., 2018).

Para la síntesis de melatonina, las células de la glándula pineal utilizan el triptófano, un aminoácido esencial que proviene de los alimentos. Este, mediante un proceso de hidroxilación, se convierte en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa, sufre una descarboxilación por la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa, y se transforma posteriormente en serotonina. Al detectar oscuridad, automáticamente se activa el sistema neuronal y se produce una descarga del neurotransmisor norepinefrina, el cual se une a los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  de los pinealocitos y activa la adenilciclase, incrementando con ello el AMP cíclico y transformando la serotonina en N-acetilserotonina por acción de la N-acetiltransferasa. Esta posteriormente se metila debido a una reacción catalizada por la enzima hidroxilindol-O-metiltransferasa y da lugar finalmente a la melatonina (Illnait, 2012).

Otros factores que también pueden influir en la síntesis de la melatonina puede ser la cantidad de folatos y vitamina B6 en el organismo los niños en la pre pubertad, pero no en

adultos, actuando como coenzimas durante la descarboxilación del triptófano (Saavedra et al., 2021).

**Figura No. 5:** Síntesis de la melatonina



(Argüelles & Bonmatí, 2015).

#### 4. Mecanismo de acción

La melatonina es capaz de ejercer sus acciones farmacológicas utilizando dos receptores principales: el receptor MT1 (cuenta con una alta afinidad) y el receptor MT2 (cuenta con una baja afinidad). Ambos receptores se encuentran situados en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, pero también pueden encontrarse en otros tejidos del cuerpo, como: el intestino, el endotelio de vasos sanguíneos y los ovarios. Asimismo,

ambos forman parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G que se encargan de inhibir la adenilatociclase. La acción de la melatonina en cada receptor es específica, ya que en el receptor MT1 la melatonina puede controlar el efecto promotor de sueño, mientras que en los receptores MT2 puede modificar el periodo del ciclo circadiano debido a su propiedad cronobiótica (Pérez et al., 2014).

Por otra parte, la melatonina es capaz activar las enzimas antioxidantes: la superóxidodismutasa, la glutatiónreductasa, la glutatiónperoxidasa y la catalasa, así como facilitar el transporte de electrones utilizando la cadena respiratoria mitocondrial, reduciendo de esta manera la pérdida neuronal por apoptosis, la formación de carbonilos, la lipoperoxidación y el daño secundario al ADN. Asimismo, la melatonina protege al citoesqueleto neuronal, el cual es el responsable de mantener las diversas formas y funciones neuronales (Pérez et al., 2014).

Se ha vinculado a la melatonina con distintos procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos, destacando su influencia en el ritmo circadiano, la liberación de hormonas cíclicas, la regulación del sistema inmunológico y su capacidad antioxidante, por lo que evita la presencia de radicales libres. Su función antioxidante posee la facilidad de atravesar las barreras corporales y cuenta con una función neuroprotectora, ya que previene el estrés oxidativo en el sistema nervioso central. Las especies reactivas de oxígeno cuentan con un efecto tóxico en la membrana mitocondrial interna, lo cual ocasiona el aumento del flujo de calcio hacia el interior del organelo y conlleva a la formación de radicales libres. El mecanismo antioxidante de la melatonina no conoce con certeza, pero se considera que esta se une a la membrana de la mitocondria y estabiliza su fluidez, normalizando con ello el flujo de calcio hacia el interior (Pérez et al., 2014).

## **5. Farmacocinética de la melatonina exógena**

### **a. Absorción**

La melatonina es una hormona que presenta una farmacocinética lineal, ya que se absorbe rápidamente y alcanza su concentración máxima en aproximadamente 45 minutos

posterior a su administración. Por otra parte, presenta baja biodisponibilidad (3-33%) debido al efecto de primer paso hepático (Tordjman et al., 2017).

La farmacocinética de la melatonina dependerá principalmente del tipo de melatonina, la vía de administración y la dosis que ingiera la persona. Al administrarse vía oral, el nivel máximo que alcanza en el plasma tarda entre 30 y 60 minutos, manteniendo la misma concentración durante aproximadamente 3-4 horas, para luego disminuir rápidamente con una semivida de entre 40 y 50 minutos (Illnait, 2012). Por otra parte, al administrarse vía intravenosa la biodegradación hepática es menos importante, ya que no se lleva a cabo el primer paso hepático. Respecto a ello, se ha demostrado que existe una relación inversa entre la biodisponibilidad de la melatonina y el área bajo la curva de las concentraciones de la 6-sulfatoxi-melatonina, donde se ha observado una baja biodisponibilidad debido al primer paso hepático (Tordjman et al., 2017).

#### **b. Distribución**

La melatonina es una hormona muy lipofílica, por lo que no se almacena directamente en la glándula pineal, sino que esta es liberada a los capilares conforme se sintetiza. Una vez en sangre, esta se une a proteínas, en su mayoría albúmina (60-70%), y se distribuye desde el plasma hacia la mayoría de los tejidos, órganos y fluidos corporales, atravesando fácilmente la barrera hematoencefálica (Pin et al., 2014).

#### **c. Metabolismo**

Luego de su distribución en el organismo, la melatonina se metaboliza en el hígado, donde sufre una hidroxilación a 6-hidroxi-melatonina por las enzimas CYP1A1 y CYP1A2 que se encuentra en el citocromo P450, seguida de conjugación de sulfato (70%) y glucurónido (30%) antes de su excreción en la orina. El metabolismo de la melatonina es muy rápido, donde la concentración de 6-hidroxi-melatonina en el plasma puede aumentar casi inmediatamente luego de que la melatonina exógena entre en la circulación sistémica (Tordjman et al., 2017).

#### **d. Excreción**

La semivida de la eliminación de la melatonina en orina es de aproximadamente 45 minutos en adultos sanos. La eliminación se encuentra constituida aproximadamente del 90% de conjugados de sulfato y glucurónido de la 6-hidroximelatonina y alrededor del 10% de la melatonina que no logra metabolizarse (Tordjman et al., 2017).

### **6. Fuentes naturales de melatonina**

La melatonina se encuentra presente en diversos alimentos, principalmente en plantas comestibles y productos de origen vegetal, conteniendo no sólo la melatonina como tal, sino también su precursor. Las concentraciones de melatonina en las plantas pueden variar, desde picogramos hasta microgramos en el tejido vegetal, pudiendo detectar la cantidad de melatonina mediante técnicas cromatográficas e inmunológicas (Ahmad et al., 2023).

La melatonina en las plantas posee un rol importante en la reducción del estrés oxidativo, en la promoción del crecimiento y la germinación de las semillas. Asimismo, la melatonina ayuda a estimular su sistema inmunológico, modular su ritmo circadiano, controlar el cierre de los estomas en las hojas y actúa como un agente antiestrés en la planta ante los distintos factores ambientales, como: la sequía, los químicos tóxicos, la radiación ultravioleta, las altas o bajas temperaturas, el estrés hídrico y el estrés biótico (Ahmad et al., 2023).

La melatonina se encuentra presente en distintos tipos de alimentos, sin embargo, la cantidad de melatonina varía respecto al tipo de alimento y entre una especie a otra, ya que esta puede distribuirse de manera desigual debido a las diferentes características dinámicas y biofísicas de los órganos del animal o la planta. Por ejemplo, en las plantas comestibles los frutos generalmente contienen una menor cantidad de melatonina a comparación de las semillas y las hojas, las cuales presentan una cantidad más elevada. Asimismo, la concentración de melatonina en los productos vegetales también se encuentra asociada con el entorno en el que se cultivan, por lo que puede variar dependiendo de la temperatura, la duración de la exposición a la luz solar, el proceso de maduración y el tratamiento agroquímico al que fue expuesta la planta (Meng et al., 2017).

**Cuadro No. 1:** Cantidad de melatonina presente en algunas plantas comestibles

Planta	Cantidad de melatonina presente	Parte de la planta en la que se encuentra
Tomate	3–114 ng/g	Fruta
Fresa	1–11 ng/g	Fruta
Arroz/cebada	300–1000 pg/g	Semilla
Maíz	14–53 ng/g	Semilla
Nueces	3–4 ng/g	Semilla
Pimienta negra	1093 ng/g	Hoja
Cúrcuma	120 ng/g	Raíz
Cilantro	7 ng/g	Semilla
Mostaza negra	129 ng/g	Semilla
Almendra	39 ng/g	Semilla
Cereza	18 ng/g	Fruta
Granada	5.5 ng/g	Fruta
Rábano blanco	485 ng/g	Bulbo

(Ahmad et al., 2023).

**Cuadro No. 2:** Cantidad de melatonina presente en algunos alimentos de origen animal

Alimento de origen animal	Cantidad de melatonina presente	Parte del animal en la que se encuentra
Cordero	1.6 ng/g	Carne
Res	2.1 ng/g	Carne
Cerdo	2.5 ng/g	Carne
Salmón	3.7 ng/g	Carne
Pollo	2.3 ng/g	Carne
Gallina	1.5 ng/g	Huevos

(Meng et al., 2017).

## 7. Usos terapéuticos actuales

### a. Resincronizador del ritmo circadiano y los ciclos vigilia-sueño

El principal uso de la melatonina se basa en su capacidad de resincronizar el ritmo circadiano y los ciclos vigilia-sueño. La melatonina ejerce una función cronobiótica sobre el núcleo supraquiasmático (NSQ), donde el control del ritmo circadiano que ejerce el NSQ

se encuentra sincronizado por la luz ambiental y también sincroniza al resto del organismo a través de la síntesis de melatonina. De igual forma, la melatonina puede actuar sobre el NSQ para mejorar dicha resincronización, donde los elevados niveles de melatonina en sangre se convertirán en los encargados de indicarle al organismo que es de noche y contribuirán a organizar el ritmo homeostático (Poza et al., 2018).

La melatonina cuenta con la función de ayudar en dicha sincronización, ya que esta actúa sobre los receptores MT1 y MT2 que se encuentran en el NSQ del hipotálamo, el cual corresponde al lugar del principal regulador circadiano. Aquí, la melatonina se encarga de resincronizar el ritmo circadiano que se encuentra desordenado, para así inducir el sueño en la persona (Kostoglou, 2013).

Asimismo, cuando la secreción endógena de melatonina disminuye o cuando el ritmo circadiano natural de la melatonina es anormal, la administración de melatonina exógena puede contribuir a mejorar la calidad del sueño del consumidor, así como aumentar su duración. Las ventajas que posee la melatonina en comparación con otros fármacos inductores del sueño, recaen comúnmente en la ausencia de síntomas de abstinencia y adicción tras su consumo. Sin embargo, la melatonina tiene una vida media sumamente corta en la circulación sistémica y posee una leve acción hipnótica (Kostoglou, 2013).

#### **b. Agente antioxidante**

Una de las principales funciones de la melatonina se encuentra relacionada con sus efectos antioxidantes. En los humanos existe un alto consumo de oxígeno en el cerebro, lo cual ocasiona la aparición de estrés oxidativo y genera moléculas tóxicas de radicales libres en el cuerpo. Estas moléculas son elevadamente reactivas y son capaces de dañar el ADN, las proteínas y la membrana celular. La melatonina entra en acción al neutralizar de manera directa los radicales tóxicos, eliminándolos de manera endógena a través de su función como antioxidante. Por ende, la melatonina se ha convertido en una opción sumamente eficaz, incluso en bajas concentraciones, para proteger a los organismos vivos ante el estrés oxidativo (Ahmad et al., 2023).

## **8. Dosificación**

La melatonina exógena debe administrarse a la misma hora, aproximadamente entre 30 y 60 minutos antes de dormir. La dosis recomendada en niños mayores de 1 año es de 1 a 3 mg de melatonina, evaluando inicialmente la necesidad que posee el niño para dormir para administrar la dosis más adecuada. En ocasiones, los niños que cuentan con trastornos neurológicos pueden necesitar dosis mayores (Pin et al., 2014). Si la dosis administrada de melatonina es muy baja, puede que esta no sea eficaz, mientras que, si es demasiado alta, pueden desaparecer los efectos cronobiológicos en el organismo y quedar sólo los hipnóticos (Pin et al., 2014).

## **9. Efectos adversos e interacciones farmacológicas**

Generalmente la melatonina exógena es bien tolerada, por lo que actualmente no se han reportado efectos adversos significativos. Según la Agencia Europea de Medicamentos, los efectos adversos pueden clasificarse de la siguiente manera: muy frecuentes ( $\geq 1/10$ ); frecuentes ( $\geq 1/100$  a  $< 1/10$ ); poco frecuentes ( $\geq 1/1,000$  a  $< 1/100$ ); raros ( $\geq 1/10,000$  a  $< 1/1,000$ ); muy raros ( $< 1/10,000$ ) (Illnait, 2012). Haciendo énfasis en ello, los efectos adversos más reportados al llevar a cabo un tratamiento con melatonina exógena han sido clasificados como raros:

- a. Psiquiátricos (irritabilidad, nerviosismo, inquietud, insomnio, sueños anormales, ansiedad).
- b. Trastornos del sistema nervioso (migraña, letargia, hiperactividad psicomotriz, mareos, somnolencia).
- c. Gastrointestinales (dolor abdominal, dolor en epigastrio, dispepsia, sequedad de boca).
- d. Vasculares (hipertensión arterial).
- e. Hepáticos (hiperbilirrubinemia, alteración de pruebas funcionales).
- f. Dermatológicos (dermatitis, sudoración nocturna, prurito, exantema, prurito generalizado, piel seca).
- g. Osteomusculares (dolor en las extremidades).
- h. Genitourinarios (síntomas menopáusicos, glucosuria, proteinuria)

(Illnait, 2012)

Entre los efectos adversos más comunes de estos se ha reportado la aparición de náusea (1.5%), cefalea (7.8%), mareo (4.0%) y somnolencia (20.33%), los cuales pueden variar respecto a la dosis de melatonina administrada, la presencia o ausencia de alteraciones del sueño y la duración del tratamiento, así como el sexo y la edad del consumidor (>1 año) (Pin & Lluch, 2011). Asimismo, debido a que la melatonina corresponde a una hormona producida naturalmente, las reacciones alérgicas que puede llegar a ocasionar en el consumidor pueden deberse principalmente a los excipientes que se encuentran en algunas formulaciones (NIH, 2024).

A pesar de ser bien tolerada, una vez se lleve a cabo el tratamiento con melatonina se debe tener precaución en pacientes con enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide o post-trasplante de órganos, ya que la melatonina es capaz de estimular la función del sistema inmunológico (NIH, 2024). Asimismo, la administración de suplementos de melatonina en niños y adolescentes pareciera ser segura, pero actualmente se carecen de estudios sobre sus efectos a largo plazo, por lo que no hay poca información al respecto. Por ende, y debido a que la melatonina corresponde a una hormona, es posible que el consumo constante de estos suplementos pueda llegar a afectar el desarrollo hormonal, afectando con ello la pubertad, los ciclos menstruales y la sobreproducción de la hormona prolactina (NIH, 2024).

Respecto a las interacciones farmacológicas de la melatonina, al metabolizarse por el citocromo P450 se debe tener especial precaución en utilizarla simultáneamente con inhibidores potentes de dicha enzima. Asimismo, la melatonina no debe utilizarse simultáneamente con otros medicamentos sedantes o hipnóticos, ya que dicha combinación puede ocasionar una sedación excesiva en el paciente (NIH, 2024). Por otra parte, se ha demostrado que el hábito de fumar, como el consumo excesivo de cafeína pueden provocar alteraciones en los niveles sanguíneos de melatonina. Esto se debe a que el consumo de tabaco disminuye los niveles de la melatonina en sangre, mientras que el consumo de cafeína puede aumentarlos (Pin & Lluch, 2011).

**Cuadro No. 3:** Influencia de los fármacos y sustancias en la secreción de melatonina

Disminuyen la sulfatoximelatonina		Aumentan la sulfatoximelatonina
Acetaminofén	Indometacina	Triptofano
Alcohol	Interleucina-2	Piridoxina
Alprazolam	Isradapina	Niacina
Aspirina	Luzindoles	Marihuana
Atenolol	Metilcobalamina	Criboheptadina
Benzarazida	Metoprolol	
Cafeína	Nicotina	
Clonidina	Nifedipina	
Dexametasona	Nisoldipina	
Diazepam	Nitrendipina	
Ditiazem	Prazosín	
Flunitrazepam	Propranolol	
Filodipina	Reserpina	
Fluoxetina	Ridazolol	
Ibuprofeno	Vitamina b12	

(Pin & Lluch, 2011).

### **C. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La cromatografía HPLC es una metodología analítica que se utiliza para la identificación, medición y separación de los componentes presentes en una muestra. Este método es ampliamente utilizado para el análisis de productos farmacológicos gracias a su precisión en términos cuantitativos y cualitativos, por lo que ha contribuido significativamente a diversos avances en la química analítica. En la cromatografía HPLC se inyecta una solución muestra en una columna que contiene la fase estacionaria. Posteriormente se bombea un líquido (fase móvil) a través de la columna a alta presión, lo

cual permite separar los componentes de la muestra en función de sus interacciones con la fase estacionaria (Kumar et al., 2023).

Los componentes presentes en la muestra migran a través de la columna a diferentes velocidades debido a sus interacciones con la fase estacionaria y la fase móvil. Estas interacciones generan una partición entre las fases, lo que provoca que cada compuesto eluya en tiempos distintos, permitiendo así su separación. La precisión de este método se basa en la capacidad de la columna para discriminar entre los analitos, en función de sus propiedades químicas y físicas, lo cual proporciona robustez para analizar diversas muestras (Kumar et al., 2023).

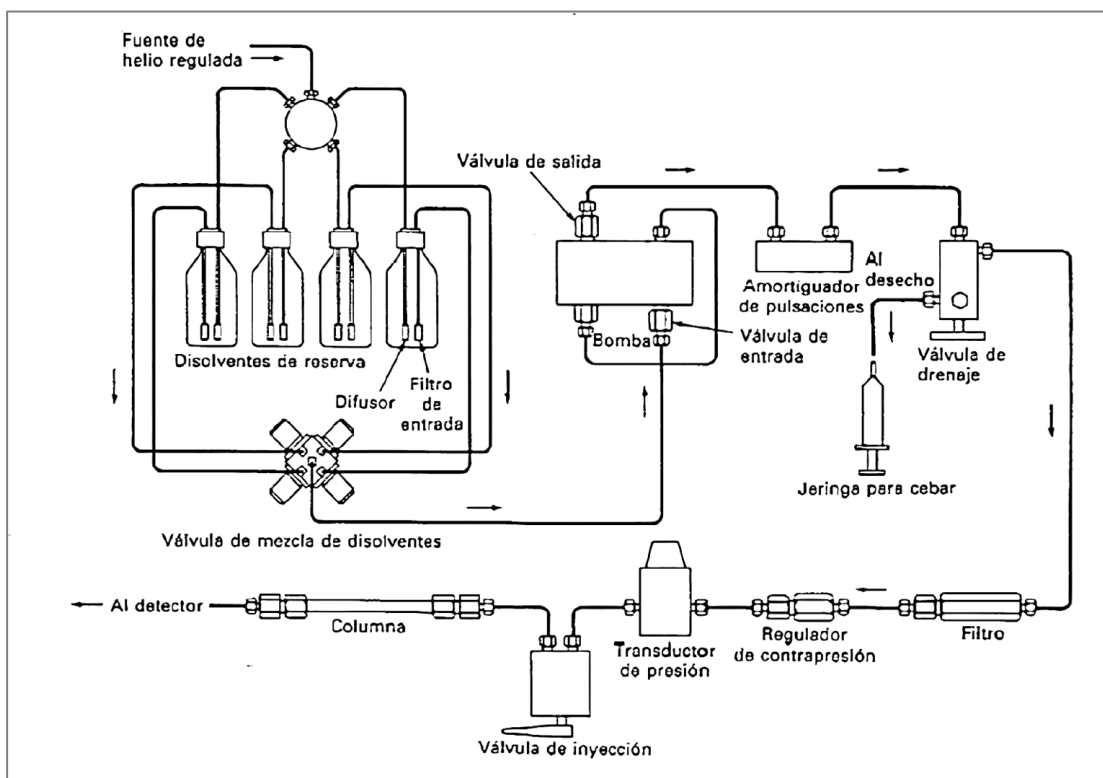
## **1. Principio**

El principio de la cromatografía HPLC se basa en la dispersión del analito dentro del material de empaque de la columna, entre la fase estacionaria y la fase móvil (eluyente). En este proceso, la estructura química del analito es la responsable de la velocidad de movimiento a través de la fase estacionaria, donde las interacciones intermoleculares que se generan entre las moléculas de la muestra y el material de empaque dan como resultado el tiempo de retención. La unidad de detección se encarga de identificar los analitos luego de que estos salen de la columna, y las señales generadas se transforman y registran mediante un sistema de gestión de datos (Manish et al., 2022).

## **2. Equipo**

Los equipos HPLC constan de una serie de elementos clave para el análisis de una muestra:

**Figura No. 6:** Partes de un cromatógrafo HPLC



(Skoog et al, 2015).

### a. Depósito de solvente

El contenido de la fase móvil se encuentra dentro de un contenedor de vidrio, la cual normalmente consiste en una mezcla de componentes líquidos polares y apolares, así como en la composición de la muestra a analizar (Ali, 2020). El tipo y la composición de la fase móvil son factores que influyen en separación los componentes:

- 1) Cromatografía HPLC en fase normal:** La fase móvil en la cromatografía HPLC de fase normal es una sustancia no polar, mientras que la fase estacionaria es una sustancia polar, dando como resultado que un el analito polar sea retenido. Un aumento de la polaridad de las moléculas de soluto puede contribuir a la adsorción, dando como resultado una elución más prolongada (Priya, 2022).

**2) Cromatografía HPLC de fase reversa:** La fase estacionaria de fase reversa es una sustancia no polar, mientras que la fase móvil es una sustancia polar o con moderada polaridad. Debido a esto, la fase estacionaria no polar contendrá los analitos menos polares durante un período más largo que los analitos más polares, dando como resultado que el componente más polar eluya primero (Priya, 2022).

#### **b. Desgasificador**

Para este estudio, los cromatógrafos a utilizar cuentan con un desgasificador que consta de un contenedor de vacío que posee 4 canales, 4 membranas tubulares de plástico y una bomba de vacío. Al momento en que este se encienda, el circuito de control se encarga de activar la bomba de vacío, la cual genera consigo un vacío parcial en el contenedor de vacío, gracias a la señal recibida mediante el sensor de presión. La bomba se encarga de aspirar los disolventes que se encuentran en las botellas a través de las membranas tubulares de plástico que posee el contenedor de vacío. Posteriormente, a medida que el disolvente atraviese los tubos, cualquier gas que se encuentre disuelto en este atravesará las membranas hasta el contenedor de vacío, los cuales ya se encontrarán desgasificados por completo (Agilent Technologies, 2021).

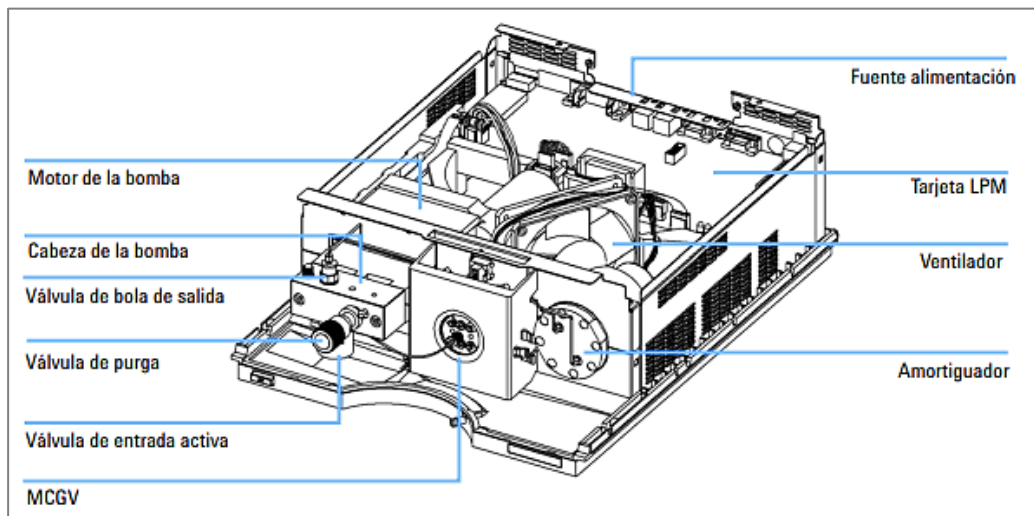
#### **c. Bomba**

La bomba en HPLC se encarga de suministrar el flujo de la fase móvil a presión y mediante caudales constantes expresado en mililitros por minuto (mL/min), por lo que cualquier cambio que se generen en ambos parámetros pueden ocasionar errores al momento de obtener los resultados. Por ende, la bomba HPLC debe contar con robustez y proporcionar las características de flujo necesarias para que estas puedan ser reproducibles ejecución tras ejecución. Los límites de presión operativa de la bomba cuentan con un amplio rango según los requisitos de análisis, donde, en una operación analítica normal, la presión de la bomba puede variar entre 2000 y 5000 psi, mientras que en aplicaciones donde se utilice cromatografía UHPLC, la presión operativa puede elevarse hasta 15000 a 18000 psi (Ali, 2020).

Los caudales normales en HPLC se encuentran en un rango de 1 a 2 ml/min, y las bombas típicas pueden alcanzar presiones de 6.000 a 9.000 psi. Durante el análisis de una muestra, la bomba puede proporcionar una composición de fase móvil isocrática (constante) o una composición de fase móvil creciente (gradiente). Asimismo, las variaciones que puedan generarse en los caudales de la fase móvil pueden afectar el tiempo de elución de los componentes de la muestra, dando lugar a errores en las mediciones (Ali, 2020).

Para este estudio se utilizará una bomba cuaternaria, la cual se encuentra compuesta por un desgasificador de vacío, una cabina de disolventes con un espacio apto para cuatro botellas de un litro, y una bomba de gradiente que posee cuatro canales. También, cuenta con una válvula de partición de alta velocidad y un dispositivo de bomba, lo cual contribuye a la generación de un gradiente por mezcla a baja presión. Este tipo de bomba consta de dos émbolos y dos canales que se encuentran conectados una unidad de amortiguación, donde la medida y suministro de disolvente se lleva a cabo a través de un dispositivo que puede generar hasta 400 bares (Agilent Technologies, 2021).

**Figura No. 7:** Bomba cuaternaria



(Agilent Technologies, 2021).

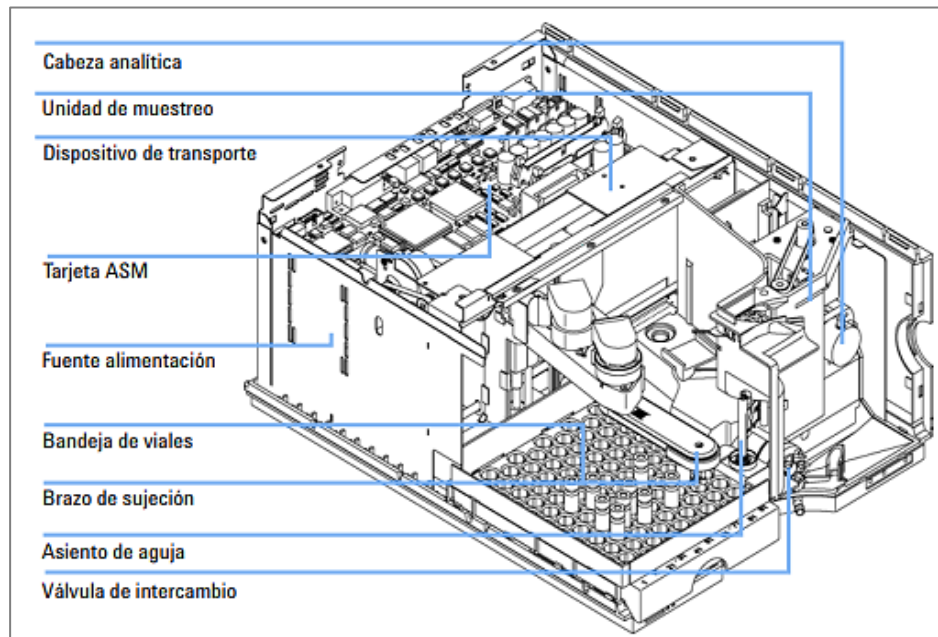
#### **d. Inyector**

Un inyector para un sistema HPLC se encarga de introducir con precisión el volumen de muestra a analizar en la columna y puede efectuarse de forma manual o automática, donde la inercia y la reproducibilidad de la inyección son necesarias para que permanezca un alto nivel de precisión en el análisis. En HPLC, la inyección de la muestra en la columna debe efectuarse lo más rápido posible, a manera de no generar una perturbación en la fase móvil, ya que su flujo debe ser constante desde la columna hasta el detector (Ali, 2020).

Para este estudio se utilizó una inyección automatizada, la cual corresponde a una alternativa que permite mejorar la productividad del laboratorio, así como eliminar errores personales al momento de la inyección (Ali, 2020). El mecanismo de transporte de los inyectores se lleva a cabo mediante un movimiento X-Z-Theta a manera de optimizar la recogida y el retorno de los viales. Por su parte, el brazo del inyector se encuentra accionado por un motor que se encarga de recoger los viales y posteriormente colocarlos debajo de la unidad de muestreo. Dicho movimiento se encuentra a su vez controlado por sensores y codificadores ópticos para garantizar un correcto funcionamiento. Por último, el dispositivo de medida siempre se lava luego de cada inyección, a manera de garantizar un mínimo arrastre de contaminantes (Agilent Technologies, 2021).

El dispositivo de cabeza analítica estándar es el responsable de proporcionar volúmenes de inyección que se encuentran comprendidos entre 0.1 y 100  $\mu$ l. La válvula de inyección consta de seis puertos y se acciona a través de un motor de alta velocidad, donde, al momento de muestreo, la válvula evita los inyectores automáticos y conecta directamente el flujo de la bomba con la columna. Por último, durante el análisis, la válvula se encarga de dirigir el flujo a través de los inyectores automáticos, garantizando así que toda la muestra se inyecte correctamente en la columna y elimine cualquier residuo antes de proceder con la siguiente lectura (Agilent Technologies, 2021).

**Figura No. 8:** Inyector automático



(Agilent Technologies, 2021).

#### **e. Columnas**

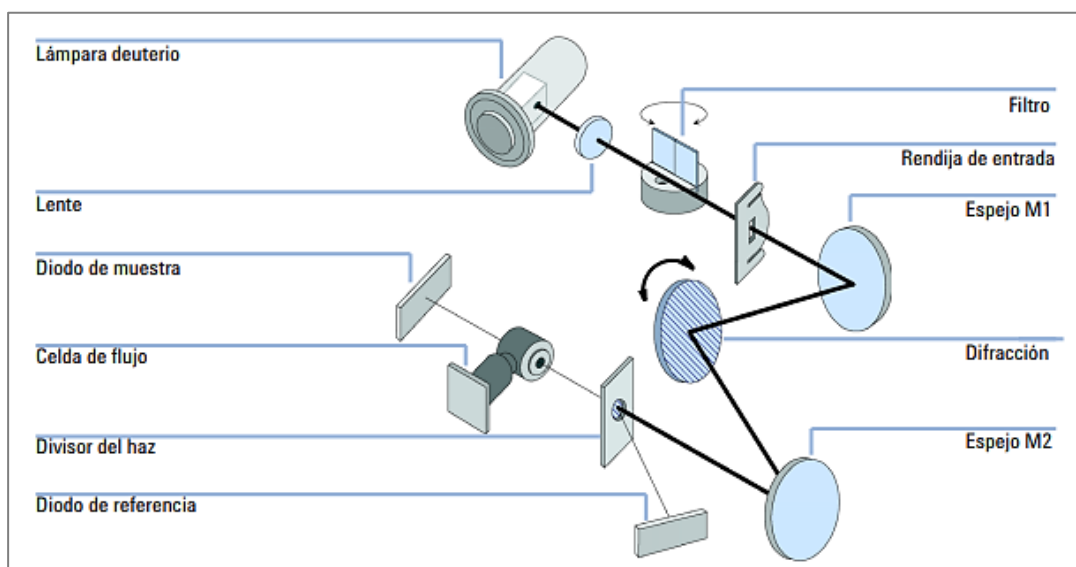
Las columnas de un equipo HPLC suelen ser de acero inoxidable pulido y miden entre 50 y 300 mm de largo, con un diámetro interno de entre 2 y 5 mm. En estas se encontrará la fase estacionaria con un tamaño de partícula de 3 a 10  $\mu\text{m}$ . La temperatura debe ser constante durante todo el análisis y debe mantenerse proporcional entre la fase móvil y la columna. La fase estacionaria de la columna se encarga de separar los componentes presentes en una muestra, utilizando para ello diversos parámetros físicos y químicos. Las pequeñas partículas que se encuentran dentro de la columna son las responsables de causar la alta contrapresión a caudales normales, donde posteriormente la bomba debe empujar con fuerza para transportar la fase móvil a través de la columna. Por ende, la columna corresponde a un componente vital y debe mantenerse en las condiciones adecuadas según las instrucciones del proveedor, para que de esta manera se logre una separación eficiente y reproducible del análisis (Ali, 2020).

## f. Detector

El detector corresponde a un componente crítico del equipo HPLC y se encuentra ubicado al final de la columna. Su importancia radica en que este es el responsable de detectar los analitos presentes en la muestra a medida que estos eluyen a través de la columna, donde posteriormente proporciona una lectura de salida hacia un registrador o computadora, dando como resultado un cromatograma de la lectura. El detector brinda una respuesta específica para aquellos componentes que fueron separados por la columna, además de proporcionar la sensibilidad requerida de la medición (Ali, 2020).

Los detectores a utilizar cuentan con un sistema óptico que constan de una fuente de radiación de una lámpara de descarga de arco de deuterio, con una longitud de onda ultravioleta (UV) de 190 a 600 nm. El haz de luz generado atraviesa inicialmente un lente, seguido de un filtro, una rendija de entrada, un primer espejo (M1), un difractor, un segundo espejo (M2) y un divisor del haz respectivamente, y llegando finalmente al diodo de la muestra. La absorción UV se lleva a cabo en la celda de flujo dependiendo de la muestra, donde la intensidad de luz que se emite se convierte posteriormente en una señal eléctrica mediante el fotodiodo de muestra (Agilent Technologies, 2021).

**Figura No. 9:** Funcionamiento del detector



(Agilent Technologies, 2021).

#### **g. Dispositivo de recopilación de datos**

Las señales generadas por el detector pueden recopilarse a través de registradores gráficos o integradores electrónicos para procesar, almacenar y reprocesar las lecturas cromatográficas obtenidas. La computadora se encarga de integrar la respuesta del detector a cada componente, por lo que se controla todos los módulos del instrumento HPLC. Esta se encarga de tomar la señal del detector para posteriormente utilizarla y determinar el tiempo de elución de los componentes de la muestra (Ali, 2020).

### **D. Validación de un método analítico**

La validación corresponde a un proceso sistemático que proporciona evidencia objetiva respecto a los requisitos específicos que debe cumplir un análisis, evaluando así el desempeño del método como tal. Por ende, la validación de un método analítico proporciona una comprensión profunda al analista de lo que el método puede producir de manera confiable, por lo que es esencial que el equipo cumpla con las especificaciones óptimas para el análisis, esté correctamente calibrado y que sea factible para la validación (Kumar et al., 2023).

Los parámetros de validación de un método analítico pueden aplicarse con base a lo indicado por la Conferencia Internacional de Harmonización (ICH por sus siglas en inglés), por la USP en su capítulo <1225> y por la Guía de la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC por sus siglas en inglés) para la Validación de Métodos Analíticos (Kumar et al., 2023). Los parámetros comúnmente recomendados por estas entidades corresponden a los siguientes:

#### **1. Especificidad**

La especificidad evalúa la capacidad del método para identificar una especie química, sin que en esta interrumpan: impurezas, excipientes u otros compuestos que pudieran estar presentes en la misma (ICH, 2023). Este parámetro se confirmó a través de la comparación del tiempo de retención obtenido de las lecturas de los estándares de melatonina y el tiempo

de retención de las muestras de gomitas de melatonina. Según lo indicado por la AOAC (2023) los tiempos de retención pueden presentar una variación de  $\pm 1$  min.

## 2. Linealidad

La linealidad del método debe evaluarse respecto a una relación lineal en todo el rango del análisis, utilizando un mínimo de 5 concentraciones. La linealidad debe inspeccionarse visualmente a través del gráfico de señales en función de la concentración del analito, donde, para confirmar que existe linealidad, los resultados de la prueba deben evaluarse utilizando métodos estadísticos como: el cálculo de la línea de regresión a través del método de mínimos cuadrados, el cálculo del coeficiente de correlación ( $R^2$ ), la intersección con el eje y, la pendiente de la línea de regresión obtenida y la suma residual de cuadrados.

Asimismo, la linealidad de un método puede evaluarse mediante la desviación de valores en la línea de regresión para ver qué tan alineados se encuentran (ICH, 2023). Según lo indicado por la AOAC (2016), este valor debe ser  $\geq 0.99$ .

### **Ecuación No. 1:** Curva de calibración

$$y = mx + b$$

#### **Donde:**

$y$  = respuesta del detector (área bajo la curva)

$x$  = concentración del analito

$m$  = pendiente de la curva

$b$  = intersección en el eje y, la cual representa la señal en ausencia de analito (blanco)

(Skoog et al., 2015)

## 3. Rango

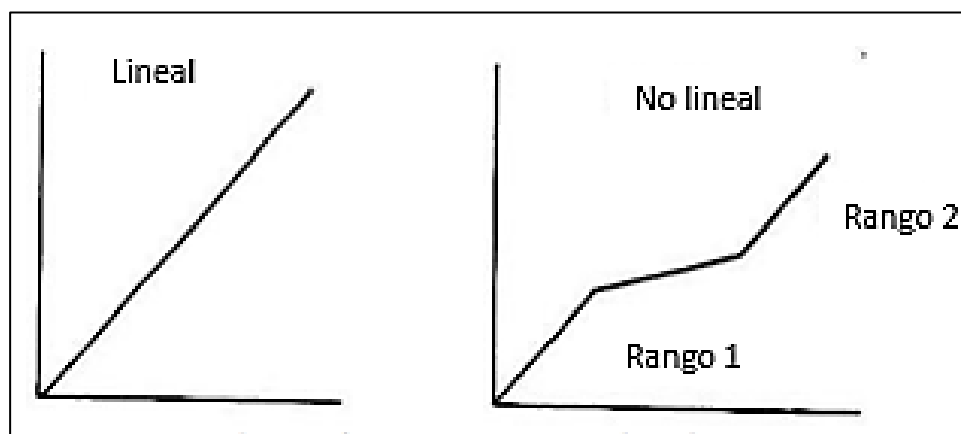
El rango de un método analítico se establece a través de la confirmación de que el método proporciona un grado aceptable en cuanto a linealidad, exactitud y precisión en el análisis de muestras que contienen cantidades de analito que se encuentran dentro o en los

extremos del rango que se ha especificado para el procedimiento analítico (ICH, 2023). Para ello, se deben considerar ciertos rangos mínimos dependiendo del tipo de muestra que se desea analizar:

- a. **Sustancia activa o producto acabado:** El rango debe encontrarse entre 80-120% respecto a la concentración de prueba;
- b. **Uniformidad del contenido:** El rango debe encontrarse entre al menos el 70-130% de la concentración de la muestra, a menos que se justifique el uso de un rango más apropiado con base a la naturaleza de la forma de dosificación de la misma.
- c. **Pruebas de disolución:** El rango debe encontrarse entre el +/-20% sobre el rango especificado.
- d. **Determinación de una impureza:** El rango debe encontrarse entre el nivel reportado de una impureza hasta el 120% de la especificación debido a que las impurezas generalmente presentan cierta potentes o toxicidad, por lo que el límite de detección/cuantificación del analito debe ser proporcional al nivel al que deben controlarse las impurezas.

(ICH, 2023)

**Figura No. 10:** Linealidad y rango de un método analítico



(Kumar et al., 2023).

#### 4. Exactitud

La exactitud se refiere al grado en que un valor medido se alinea proporcionalmente con el valor real, por lo que, en la práctica, la exactitud hace referencia a la discrepancia obtenida entre el valor real y el valor medio obtenido durante el análisis. Para calcular la exactitud de un método analítico, se deben utilizar varias muestras con concentraciones conocidas de analito, las cuales luego se compararán con las soluciones en blanco y estándar, a manera de garantizar que no se encuentren interferencias que pudieran afectar la medición.

La exactitud se calcula en forma de porcentaje del analito recuperado y se expresa en términos de “recuperación”, proporcionando así una medida que permite conocer qué tan bien el método analítico es capaz de reflejar los valores reales de las muestras analizadas (Kumar et al., 2023). Según lo indicado por la AOAC (2016), el rango de aceptación del %R debe mantenerse en entre el 98-102%.

**Ecuación No. 2:** Porcentaje de recuperación (%R)

$$\%R = \frac{CE}{CT} * 100$$

**Donde:**

$\%R$  = porcentaje de recuperación

$CE$  = cantidad de melatonina encontrada

$CT$  = cantidad de melatonina teórica

(ICH, 2023)

#### 5. Precisión

La precisión en la validación de un método analítico, se refiere a la dispersión de las mediciones efectuadas durante el análisis en condiciones específicas, de distintas muestras del mismo material. Por ende, la precisión corresponde a un parámetro crítico que se encarga de evaluar la reproducibilidad del proceso analítico, constando de tres

componentes: la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad (Kumar et al., 2023).

#### **a. Repetibilidad**

La repetibilidad corresponde a la variación de mediciones que experimenta el analista al llevar a cabo el análisis en un instrumento específico. Para ello, se debe llevar a cabo el análisis de varias réplicas de los estándares utilizando el procedimiento analítico, para poder determinar la repetibilidad del método. Posteriormente debe calcularse un valor de recuperación (Kumar et al., 2023). Según lo indicado por la AOAC (2016), el rango de aceptación del %CV debe ser  $\leq 2.0\%$ .

#### **Ecuación No. 3: Desviación estándar ( $\sigma$ )**

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(Xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

#### **Donde:**

$\sigma$  = desviación estándar de las lecturas del área bajo la curva de los estándares

$Xi$  = lectura individual del área bajo la curva para cada estándar

$\bar{X}$  = media de las lecturas del área bajo la curva

$n$  = número de datos

(Skoog et al., 2015)

#### **Ecuación No. 4: Coeficiente de variación (%CV)**

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} * 100$$

#### **Donde:**

$\%CV$  = coeficiente de variación

$\sigma$  = desviación estándar de las lecturas del área bajo la curva de los estándares

$\bar{X}$  = media de las lecturas del área bajo la curva

(ICH, 2023)

### **b. Precisión intermedia**

La precisión intermedia se refiere a las variaciones que pueden presentarse dentro de los laboratorios, como lo pueden ser: diferentes días de análisis, diferentes analistas y diferentes equipos, entre otros aspectos (ICH, 2023). Según lo indicado por la AOAC (2016), el rango de aceptación del %CV debe ser  $\leq 2.0\%$ .

### **c. Reproducibilidad**

La reproducibilidad se refiere a la fluctuación de condiciones que se genera dentro del laboratorio en días diferentes, con distintos instrumentos y con distintos analistas. Estas fluctuaciones se encargan de garantizar que exista una comprensión integral respecto a la confiabilidad y reproducibilidad del método analítico al exponerse ante distintas condiciones y ante distintos operadores (Kumar et al., 2023).

## **6. Límite de detección (LOD)**

El límite de detección de un método analítico se refiere a la cantidad mínima de analito presente en una muestra, el cual puede identificarse, pero no cuantificarse con precisión, proporcionando de esta manera un indicador fundamental para evaluar la sensibilidad del método (Kumar et al., 2023). Según lo indicado por el ICH (2023), el LOD debe ser menor a la concentración mínima esperada.

### **Ecuación No. 5: Límite de detección (LOD)**

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

**Donde:**

$LOD$  = límite de detección

$\sigma$  = desviación estándar de las lecturas del área bajo la curva de la solución blanco

$S$  = pendiente obtenida de la curva de calibración

(ICH, 2023)

## 7. Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación de un método analítico se refiere a la mínima cantidad de analito presente en una muestra, el cual es medido cuantitativamente mediante parámetros de precisión y exactitud. Este límite se utiliza como un parámetro de prueba cuantitativo para evaluar los niveles de analitos bajos dentro de una matriz de prueba, siendo esencial para la identificación impurezas o contaminantes que pudieran encontrarse en las muestras (Kumar et al., 2023). Según lo indicado por el ICH (2023), el LOD debe ser menor a la concentración mínima esperada.

**Ecuación No. 6:** Límite de cuantificación (LOQ)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

**Donde:**

$LOQ$  = límite de cuantificación

$\sigma$  = desviación estándar de las lecturas del área bajo la curva de la solución blanco

$S$  = pendiente obtenida de la curva de calibración

(ICH, 2023)

## 8. Robustez

La robustez de un parámetro analítico corresponde a una medida para evaluar la confiabilidad del método en condiciones específicas y su capacidad para resistir modificaciones leves en el método. Este parámetro permite garantizar que el método analítico permanece confiable y genera resultados consistentes, a pesar de verse modificado y sometido a ciertas variaciones en su metodología. Por ende, los métodos robustos cuentan con la capacidad de ser menos sensibles a los cambios implementados por el analista,

contribuyendo de esta manera a la confiabilidad del método en distintas aplicaciones analíticas (Kumar et al., 2023).

## **IV. Marco metodológico**

### **A. Objetivos**

#### **Generales**

1. Diseñar un método analítico mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala.
2. Demostrar que el método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), es un método confiable y robusto para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala.

#### **Específicos**

1. Evaluar los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y robustez del método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita.
2. Cuantificar la melatonina presente en cada muestra de gomita mediante el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
3. Comparar la cantidad de melatonina obtenida mediante el análisis con la cantidad declarada en las etiquetas nutricionales de los productos.

### **B. Hipótesis de investigación**

1. **Hi:** El método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es un método de análisis idóneo para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala.

2. **Ho:** El método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) no es un método de análisis idóneo para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala.

### C. Variables

**Cuadro No. 4:** Variables independientes del estudio

<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Indicador</b>	<b>Definición operacional</b>
<b>Preparación de las soluciones de melatonina</b>	Independiente	Proceso que se lleva a cabo para el tratamiento de una solución estándar o muestra antes de su análisis, a manera de asegurarse de que se encuentre en forma adecuada para ser analizada.	Lectura correcta de cada solución por parte del equipo HPLC	Se preparó una solución madre de melatonina en metanol (1000 ppm) y cinco estándares (1, 25, 50, 75, 100 ppm).
<b>Formulación de las gomitas de melatonina a analizar</b>	Independiente	Determinación de la cantidad de melatonina presente en las muestras de gomitas a analizar.	Porcentaje de error de la melatonina detectada respecto a la cantidad de melatonina indicada en la etiqueta nutricional	Se calculó la cantidad de melatonina en la muestra, utilizando la regresión lineal de las soluciones estándar de melatonina.
<b>Incertidumbre del equipo y cristalería utilizada para el análisis</b>	Independiente	Medida de cuánto pueden variar las mediciones del análisis debido a las	Valor obtenido de la incertidumbre combinada de cada medición.	Se calculó la incertidumbre combinada en cada medición y cálculo efectuado para

		limitaciones que presentan los instrumentos y equipos.		obtener los resultados finales.
--	--	--	--	---------------------------------

En el cuadro anterior se presentan las variables independientes del estudio, organizadas en cinco columnas. En la primera y segunda columna se encuentra el nombre de la variable y su clasificación respectivamente. En la tercera columna se describe el significado de la variable de manera teórica, en la cuarta columna se indican los criterios que se utilizaron para evaluar de manera práctica dicha variable, y, en la quinta columna, se explica cómo se llevó a cabo la medición para recolectar los datos.

**Cuadro No. 5:** Variables dependientes del estudio

<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Indicador</b>	<b>Definición operacional</b>
<b>Especificidad del método</b>	Dependiente	La capacidad del método para medir exclusivamente la melatonina sin interferencias de otros componentes en las gomitas.	Tiempo de retención de los estándares y muestras.	Se compararon los tiempos de retención obtenidos de los cromatogramas de los estándares y las muestras de gomitas.
<b>Linealidad del método</b>	Dependiente	Capacidad que posee un método para generar resultados directamente proporcionales de la concentración de la muestra dentro de un	Coefficiente de correlación ( $R^2$ ) obtenido de la regresión lineal para evaluar el ajuste de las lecturas	Se efectuó una regresión lineal utilizando las soluciones estándar de melatonina, donde cada solución se inyectó seis veces. Luego, se graficaron las áreas bajo la curva del pico en función de

		rango específico		las concentraciones de las soluciones estándar de melatonina. Finalmente, se utilizó la ecuación obtenida de la regresión lineal para evaluar el $R^2$ .
<b>Exactitud del método</b>	Dependiente	La proximidad de los resultados medidos respecto a los valores reales o esperados.	Porcentaje de recuperación respecto a la cantidad de melatonina teórica de los estándares.	Se llevaron a cabo las lecturas en triplicado de las soluciones estándar de melatonina a 1, 50 y 100 ppm. Luego se calculó el respectivo %R.
<b>Repetibilidad del método</b>	Dependiente	Capacidad del método para producir resultados consistentes bajo las mismas condiciones operativas.	Desviación estándar y coeficiente de variación obtenido en el día 1.	Se analizaron las soluciones estándar de melatonina a 1, 50 y 100 ppm el mismo día. Luego se calcularon los %CV respecto al promedio del área bajo la curva de los estándares.
<b>Precisión intermedia del método</b>	Dependiente	Capacidad del método para producir resultados consistentes ante pequeñas variaciones controladas.	Desviación estándar y coeficiente de variación obtenido en el día 2.	Se analizaron las soluciones estándar de melatonina a 1, 50 y 100 ppm en un día diferente. Luego se calcularon los %CV respecto al promedio del área bajo la curva de los estándares y se compararon con los %CV obtenidos del día 1.

<b>Límite de detección del método</b>	Dependiente	Las concentraciones mínimas de melatonina que el método puede detectar con precisión.	Valor lo suficientemente bajo para detectar con precisión el analito en las concentraciones previstas.	Se inyectó un total de 20 veces el blanco de metanol/agua (50:50) al equipo, donde a partir de los datos obtenidos del modelo de regresión lineal y de la media del área bajo la curva, se determinó el LOD del método.
<b>Límite de y cuantificación del método</b>	Dependiente	Las concentraciones mínimas de melatonina que el método puede cuantificar con precisión.	Valor lo suficientemente bajo para cuantificar con precisión el analito en las concentraciones previstas.	Utilizando el modelo de regresión lineal y la media del área bajo la curva de las 20 lecturas, se determinó el LOQ del método
<b>Robustez del método</b>	Dependiente	Capacidad del método para mantener resultados consistentes ante pequeñas variaciones en las condiciones experimentales.	Resultados de los parámetros de validación que se encontraron dentro de los respectivos rangos de aceptación.	Se efectuaron de igual forma las lecturas de las muestras, los estándares y la solución blanco utilizando una columna diferente, pero con el mismo cromatógrafo HPLC y las mismas condiciones de análisis. Luego se evaluaron los mismos parámetros de validación (especificidad, linealidad, exactitud, precisión,

				LOD y LOQ), efectuando los cálculos correspondientes para cada uno de ellos.
--	--	--	--	--

En el cuadro anterior se presentan las variables dependientes del estudio, organizadas en cinco columnas. En la primera y segunda columna se encuentra el nombre de la variable y su clasificación respectivamente. En la tercera columna se describe el significado de la variable de manera teórica, en la cuarta columna se indican los criterios que se utilizaron para evaluar de manera práctica dicha variable, y, en la quinta columna, se explica cómo se llevó a cabo la medición para recolectar los datos.

## D. Población

Suplementos dietéticos de melatonina que se comercializan en Guatemala.

## E. Muestra

1. **Tamaño de la muestra:** dos lotes de dos marcas de suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita que se comercializan y están registrados en Guatemala.
2. **Muestreo por conveniencia:** para este estudio se tomarán en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión:
3. **Criterios de inclusión:**
  - a. Suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita que se comercializan y están registrados en Guatemala.
  - b. Suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita de cualquier sabor.
  - c. Suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita que poseen un precio menor o igual a Q300.00.

#### **4. Criterios de exclusión:**

- a. Suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita que se comercializan en Guatemala, pero que no se encuentran registrados.
- b. Suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita que poseen un precio mayor a Q300.00.

## **F. Procedimiento**

### **1. Revisión bibliográfica**

Inicialmente se llevó a cabo la revisión bibliográfica de los aspectos involucrados en este estudio. Para ello, se buscó información relacionada con los suplementos dietéticos, la melatonina, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y los parámetros involucrados para la validación de un método analítico.

### **2. Elaboración del plan de trabajo**

Con la información obtenida, se elaboró el plan de trabajo para este estudio el que incluye los objetivos propuestos, la metodología y el cronograma de tiempo estimado para desarrollar cada aspecto involucrado en el trabajo de investigación.

### **3. Revisión e integración de los aspectos fundamentales del trabajo**

El trabajo de investigación se revisó y posteriormente se consolidaron los elementos clave del trabajo, con el fin de asegurar que la información fuera precisa, coherente y que se encontrara bien organizada para proceder a la experimentación.

### **4. Experimentación y análisis de resultados**

#### **a. Preparación de soluciones de melatonina**

Se preparó una solución madre de melatonina a una concentración de 1000 ppm en metanol/agua (50:50) grado HPLC y se efectuó la curva de calibración de estándares de melatonina en metanol/agua (50:50) grado HPLC a cinco concentraciones diferentes: 1, 25, 50, 75, 100 ppm.

### 1) Preparación solución madre de melatonina

Inicialmente se pesaron 100 mg de melatonina, utilizando una balanza analítica y se transfirieron a un balón aforado de 100 mL. Se añadió una pequeña cantidad de metanol/agua (50:50) grado HPLC para disolver completamente la melatonina y posteriormente se completó el volumen.

### 2) Preparación soluciones estándar de melatonina

**Ecuación No. 7: Dilución**

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

**Donde:**

$C_1$  = Concentración de la solución madre

$V_1$  = Volumen de la solución madre necesaria para la preparación del estándar

$C_2$  = Concentración final deseada

$V_2$  = Volumen final de la solución diluida

(Skoog et al., 2015)

Según la Ecuación No. 6:

- a) Solución estándar 1 ppm:** Se tomaron 0.1 mL de la solución madre, se transfirieron a un balón aforado de 100 mL y se diluyeron con 100 mL de metanol/agua (50:50) grado HPLC.

- b) Solución estándar 25 ppm:** Se tomaron 2.5 mL de la solución madre, se transfirieron a un balón aforado de 100 mL y se diluyeron con 100 mL de metanol/agua (50:50) grado HPLC.
- c) Solución estándar 50 ppm:** Se tomaron 5 mL de la solución madre, se transfirieron a un balón aforado de 100 mL y se diluyeron con 100 mL de metanol/agua (50:50) grado HPLC.
- d) Solución estándar 75 µg/mL:** Se tomaron 7.5 mL de la solución madre, se transfirieron a un balón aforado de 100 mL y se diluyeron con 100 mL de metanol/agua (50:50) grado HPLC.
- e) Solución estándar 100 µg/mL:** Se tomaron 10 mL de la solución madre, se transfirieron a un balón aforado de 100 mL y se diluyeron con 100 mL de metanol/agua (50:50) grado HPLC.

#### **b. Preparación de las muestras de gomitas de melatonina**

Para la cuantificación de melatonina se escogieron dos marcas comerciales y un total de cuatro muestras de suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita que se comercializan en Guatemala.

##### **1) Preparación de muestras de gomitas sin fortificar**

Inicialmente, se pesaron 10 muestras individuales de cada lote y marca de gomitas de melatonina, a manera de obtener un peso promedio de cada gomita. Con base al peso promedio, se pesó la cantidad necesaria de gomita (producto en estudio), para extraer el equivalente a 2.5 mg de melatonina. Los trozos se solubilizaron en una pequeña porción de metanol/agua (50:50) grado HPLC, se transfirieron a un balón de 50 mL y se completó el volumen para obtener una concentración de 50 ppm.

Todas las soluciones se filtraron a través de una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de 0.45 µm, se colocaron en un vial para HPLC y se procedió a su cuantificación en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución.

## **2) Preparación de muestras de gomitas fortificadas**

Para la preparación de las muestras de gomitas fortificadas se añadió una cantidad conocida de melatonina a cada muestra antes de su análisis, a manera de evaluar la presencia de la melatonina en las muestras.

Para ello, se llevó a cabo el mismo procedimiento indicado en la sección 1) para el pesado de las muestras de gomitas. Al momento de diluir las muestras en una porción de metanol/agua (50:50) grado HPLC, se agregaron 2.5 mg de melatonina extra para obtener soluciones doblemente concentradas. Posteriormente, se procedió a transferir la solución a un balón aforado de 50 mL y se completó el volumen con metanol/agua (50:50) grado HPLC. Las soluciones se filtraron y colocaron en viales según lo indicado en la sección 1).

### **c. Condiciones del cromatógrafo HPLC:**

Todos los análisis se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

- 1) Fase móvil: metanol/ agua (50:50) grado HPLC
- 2) Solvente de los estándares y las muestras: metanol/ agua (50:50) grado HPLC.
- 3) Velocidad de flujo: 0.5 mL/min
- 4) Tiempo por corrida: 5 min
- 5) Volumen de inyección: 20  $\mu$ L
- 6) Longitud de onda de detección: UV/VIS a 220 nm.

### **d. Cuantificación de melatonina en las muestras**

Para determinar la concentración de melatonina en cada muestra se utilizó la ecuación generada por la curva de calibración de las soluciones estándar de melatonina, donde se despejó la variable  $x$ , sustituyendo el área bajo la curva de las muestras en la variable  $y$ . Posteriormente se calculó la cantidad de melatonina presente en la muestra, con base a la cantidad pesada para el equivalente a 2.5 mg de melatonina y el promedio de las 10 gomitas del lote respectivo. Finalmente, se procedió a calcular el porcentaje de

recuperación en cada caso, con base a la cantidad de melatonina por gomita que se encontraba indicada en la etiqueta de cada marca, utilizando la ecuación no. 2.

## **G. Diseño de investigación**

En este estudio se llevó a cabo el diseño y validación del método por cromatografía HPLC, para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala. Para la validación de este, se evaluaron los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y robustez.

Posterior a la validación del método, se procedió a la cuantificación de melatonina presente en las muestras de gomitas, valor obtenido se comparó con la cantidad de melatonina indicada en las etiquetas nutricionales de las muestras. A través del análisis, se pretendía evaluar la factibilidad de este método analítico para la cuantificación de ingredientes activos en suplementos dietéticos en forma de gomita, así como evaluar si dichos productos cumplen con lo indicado en sus etiquetas nutricionales.

## **H. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo para cada parámetro de validación efectuado:

- 1. Linealidad y rango:** para medir la linealidad del método, se calculó el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) obtenido de la regresión lineal de los estándares de melatonina, para evaluar el ajuste lineal de las lecturas.
- 2. Exactitud:** para medir la exactitud del método, se calculó el porcentaje de recuperación obtenido a partir de las lecturas de las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas. Posteriormente se calculó su respectivo porcentaje de recuperación.

3. **Precisión:** para medir la precisión del método respecto a repetibilidad y precisión intermedia, se evaluó la desviación estándar y coeficiente de variación obtenido de los resultados las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas. Para la repetibilidad, se evaluaron el mismo día y para la precisión intermedia se evaluaron en un día diferente.
4. **Límite de detección y cuantificación:** los límites del método se calcularon a partir de los resultados obtenidos del modelo de regresión lineal y de la media del área bajo la curva de la solución blanco metanol/agua (50:50).
5. **Cuantificación real de melatonina:** para determinar la cantidad real de melatonina contenida en las muestras de gomitas, se calculó el porcentaje de recuperación respecto a la cantidad de melatonina detectada experimentalmente con la cantidad de melatonina indicada en la etiqueta nutricional de la muestra.

Se llevó a cabo el cálculo del promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada conjunto de datos, así como el análisis de la tabla ANOVA para las regresiones lineales:

6. **Promedio:** el promedio se calculó sumando los valores obtenidos en cada ensayo y dividiéndolos entre el número total de observaciones, lo cual permitió identificar el valor central representativo de cada conjunto de datos. Su utilidad radicó en ofrecer una medida base para comparar los resultados y evaluar la cercanía de los datos entre sí.
7. **Desviación estándar:** la desviación estándar se empleó para medir cuánto variaban los datos con respecto al promedio, proporcionando información sobre la dispersión y ayudando a determinar la precisión del método.
8. **Coficiente de variación:** el coeficiente de variación consistió en el cociente entre la desviación estándar y el promedio, el cual se expresó en porcentaje y se utilizó para

comparar la variabilidad relativa entre diferentes conjuntos de datos, independientemente de sus unidades o escalas.

- 9. Tabla ANOVA:** la tabla ANOVA se utilizó para evaluar si los modelos de regresión obtenidos fueron estadísticamente significativos.

## V. Marco operativo

### A. Recolección y tratamiento de los datos

Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo HPLC Agilent Series modelo 1100, con 2 columnas distintas: Hypersil ODS y Eclipse Plus. Se utilizaron 2 columnas HPLC distintas para evaluar la robustez del método debido a la disponibilidad limitada de un segundo equipo HPLC. Esto permitió verificar la consistencia del método sin la necesidad de utilizar otro equipo. Por otra parte, para la recolección y tratamiento de datos se utilizó el Software ChemStation y Microsoft Excel respectivamente.

### B. Recursos

#### 1. Recursos humanos

- a. **Autora:** Evelyn Paola Girón Gramajo
- b. **Asesora:** Licenciada Ana Luisa Mendizábal
- c. **Revisor:** Licenciado Sergio Sánchez

#### 2. Recursos materiales

- a. **Estándares:** melatonina
- b. **Muestras:** dos lotes de dos marcas de suplementos dietéticos de melatonina en forma de gomita que se comercializan y están registrados en Guatemala.

#### 3. Reactivos

- a. Metanol grado HPLC
- b. Agua grado HPLC
- c. Melatonina

#### **4. Equipo**

- a. 1 cromatógrafo HPLC Agilent Series modelo 1100
- b. 1 columna Hypersil ODS
- c. 1 columna Eclipse Plus
- d. 1 balanza analítica
- e. 1 micropipeta

#### **5. Cristalería**

- a. 6 balones aforados de 100 mL
- b. 12 balones aforados de 50 mL

## VI. Resultados

### A. Parámetros de validación

**Cuadro No. 6:** Resultados de la especificidad del método

Promedio del $t_R$ del estándar 3 (min)	Promedio del $t_R$ de la marca A (min)	Promedio del $t_R$ de la marca B (min)	Cumplimiento ( $t_R \leq 1$ min)
2.022	1.996 (var.=0.026)	1.994 (var.=0.028)	Cumple

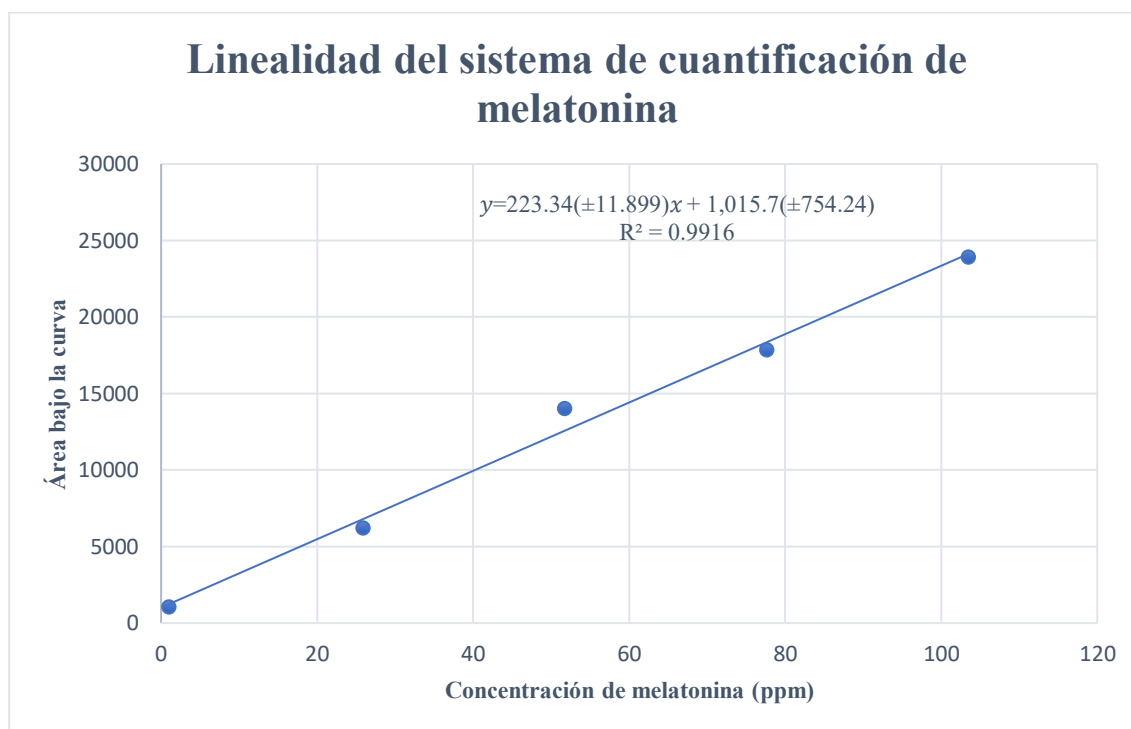
En el cuadro anterior se muestra el promedio de los tiempos de retención ( $t_R$ ) obtenidos de la solución estándar preparada a una concentración equivalente a la de las muestras (51.75 ppm) y el promedio de los  $t_R$  de las muestras de gomitas de melatonina, los cuales se encuentran detallados en los Cuadros No. 47 y 50 respectivamente (Anexo E). Según los rangos establecidos, el  $t_R$  debe encontrarse en un rango de  $\leq 1$  min. respecto al  $t_R$  de los estándares para considerar que existe especificidad del método. Al comparar los  $t_R$  de las muestras respecto al estándar, pudo observarse que los estos fueron similares entre sí, encontrándose dentro del rango aceptable.

**Cuadro No. 7:** Resultados de la linealidad del método

Pendiente	Intercepto en y	$R^2$	Cumplimiento ( $R^2 \geq 0.99$ )
$223.34(\pm 11.899)x$	1,015.7( $\pm 754.24$ )	0.9916	Cumple

En el cuadro anterior se muestra el modelo de regresión lineal utilizado para evaluar la linealidad del método. La recta está definida por la ecuación No. 1 ( $y=mx+b$ ) y su ajuste se verificó a través del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) calculado a partir del promedio de las áreas bajo la curva de cada concentración, los cuales se detallan en el Cuadro No. 47 (Anexo E). Según los rangos establecidos, el coeficiente de correlación debe ser  $\geq 0.99$  para considerar que existe una buena linealidad del método. El valor de  $R^2$  obtenido se mantuvo dentro del rango aceptable.

**Figura No. 11:** Linealidad del sistema de cuantificación de melatonina



**Cuadro No. 8:** Resultados de la exactitud del método

Concentración teórica (ppm)	Promedio de la concentración experimental (ppm)	%R	Cumplimiento (%R 98-102%)
1.035	1.044	100.87%	Cumple
51.75	51.86	100.21%	
103.5	103.56	100.06%	

En el cuadro anterior se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos (%R) a partir de las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente. Los promedios de las concentraciones experimentales se detallan en el Cuadro No. 48 (Anexo E). Según los rangos establecidos, el %R debe mantenerse en entre el 98-102% para considerar que existe exactitud del método. Los %R obtenidos se mantuvieron dentro del rango aceptable.

**Cuadro No. 9:** Resultados de la repetibilidad del método

Concentración experimental (ppm)	Promedio de las áreas bajo la curva	Desviación estándar de las áreas bajo la curva	%CV	Cumplimiento (%CV ≤ 2.0%)
1.035	1,056.16	1.20162	0.1138%	Cumple
51.75	14,043.2	112.5192	0.8012%	Cumple
103.5	24,194.3	113.318	0.4684%	Cumple

En el cuadro anterior se muestran los resultados de los coeficientes de variación obtenidos (%CV) a partir de las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente. Para obtener los %CV se utilizó el promedio de las áreas bajo la curva y sus respectivas desviaciones estándar, las cuales se detallan en el Cuadro No. 48 (Anexo E). Según los rangos establecidos, el %CV debe ser  $\leq 2.0\%$  para considerar que existe repetibilidad del método. En todos los casos, los resultados se mantuvieron dentro del rango aceptable.

**Cuadro No. 10:** Resultados de la precisión intermedia del método

Concentración experimental (ppm)	Día de análisis	Promedio de las áreas bajo la curva	Desv. estándar de las áreas bajo la curva	%CV	Promedio del %CV	Cumplimiento (%CV ≤ 2.0%)
1.035	1	1,056.16	1.20162	0.1138%	0.2860%	Cumple
	2	1,054.44	4.83186	0.4582%		
51.75	1	14,043.2	112.5192	0.8012%	0.6503%	Cumple
	2	14,045.31	70.1283	0.4993%		
103.5	1	24,194.3	113.318	0.4684%	0.6611%	Cumple
	2	24,195.28	206.546	0.8537%		

En el cuadro anterior se muestran los resultados de los coeficientes de variación obtenidos (%CV) en dos días distintos de análisis, a partir de las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente. Para obtener los %CV se utilizó el promedio de las áreas bajo la curva y sus respectivas desviaciones estándar, las cuales se detallan en los Cuadros No. 48 y 49 (Anexo E). La precisión intermedia se determina comparando la variabilidad entre ambos

días y se considera aceptable si el %CV general es  $\leq 2.0\%$ . En ambos días de análisis los resultados individuales se mantuvieron dentro del rango aceptable y el promedio general obtenido para cada concentración también cumplió con el criterio establecido.

**Cuadro No. 11:** Resultados del LOD y LOQ del método

<b>LOD (ppm)</b>	<b>LOQ (ppm)</b>
0.0083	0.0252

En el cuadro anterior se muestran los resultados obtenidos de los parámetros LOD y LOQ. Para calcular ambos parámetros se utilizó el modelo de regresión lineal mostrado en la Figura No. 11 y el promedio de las áreas bajo la curva correspondientes a las lecturas de la solución blanco, el cual se detalla en el Cuadro No. 52 (Anexo E). Los resultados obtenidos de ambos parámetros sugieren que el método posee una alta sensibilidad para detectar y cuantificar concentraciones bajas del analito.

**Cuadro No. 12:** Resultados de la robustez del método

<b>Parámetro</b>	<b>Columna Hypersil ODS</b>	<b>Columna Eclipse Plus</b>	<b>Cumplimiento (no hay variación entre columnas)</b>
<b>Especificidad (min)</b>	2.022	1.958	Cumple
<b>Linealidad (<math>R^2</math>)</b>	0.9916	0.9908	Cumple
<b>Exactitud (%R)</b>	100.38%	100.44%	Cumple
<b>Repetibilidad (%CV)</b>	0.4611%	0.5313%	Cumple
<b>Precisión intermedia (%CV)</b>	0.5989%	0.6317%	Cumple
<b>LOD (ppm)</b>	0.0083	0.0086	No aplica
<b>LOQ (ppm)</b>	0.0252	0.0262	No aplica

En el cuadro anterior se muestran los resultados obtenidos de la robustez del método, la cual se evaluó mediante el uso de dos columnas cromatográficas diferentes. Al comparar los resultados obtenidos de los distintos parámetros de validación utilizando ambas columnas, pudo observarse que los resultados fueron consistentes y se mantuvieron dentro de los rangos de aceptación establecidos.

## B. Cuantificación de melatonina en las muestras de gomitas

**Cuadro No. 13:** Resultados de la cuantificación de melatonina en gomitas

<b>Marca A (4 mg/gomita)</b>		<b>Marca B (3.3 mg/gomita)</b>		<b>Cumplimiento (%R 90-110%)</b>
<b>Lote 1 (%R)</b>	<b>Lote 2 (%R)</b>	<b>Lote 1 (%R)</b>	<b>Lote 2 (%R)</b>	
109.42%	109.33%	93.73%	93.45%	Cumple

En el cuadro anterior se muestran los %R de la cantidad de melatonina por gomita obtenida para cada marca. En ambos casos se evaluó la cuantificación respecto al promedio de la cantidad de melatonina por gomita encontrada (Cuadro No. 54, Anexo E) y la cantidad indicada en la etiqueta nutricional. Según los rangos establecidos, los ingredientes activos pueden presentar una variación del 90-110% respecto al valor declarado. Al comparar los resultados obtenidos en ambos lotes para cada marca, se observó que los %R fueron consistentes entre sí y se mantuvieron dentro del rango de aceptación establecido.

## **VII. Discusión de resultados**

De acuerdo con los objetivos planteados, se procedió a efectuar el análisis respectivo para la validación del método por cromatografía HPLC, con el fin de evaluar si este consistía en un método confiable para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala.

### **A. Especificidad**

Para la especificidad se analizó principalmente el estándar preparado a una concentración equivalente a la de las muestras (51.75 ppm), en el cual se observó un tiempo de retención promedio de 2.022 minutos (Cuadro No. 6).

Respecto a las muestras de la marca A, el pico obtenido presentó un tiempo de retención promedio de 1.999 minutos para el lote 1 y de 1.993 minutos para el lote 2. Para las muestras de la marca B, el pico obtenido presentó un tiempo de retención promedio de 2.002 minutos para el lote 1 y de 1.986 minutos para el lote 2. Al comparar los picos de melatonina en los cromatogramas de la solución estándar con los picos de melatonina en las muestras de gomitas, pudo observarse que todos se encontraron en un tiempo de retención similar y ningún tiempo de retención se encontró fuera del rango de  $\pm 1$  min. establecido por la AOAC (2023), lo cual evidencia la presencia de melatonina en las muestras. Asimismo, al observar los cromatogramas de las muestras, se aprecia una clara separación de la melatonina respecto a los otros compuestos presentes en la formulación de las gomitas, prevaleciendo un pico de melatonina bien definido con un mayor porcentaje de área respecto al resto de picos.

Las muestras fortificadas se analizaron con el fin de verificar si el método analítico era capaz de producir resultados que reflejaran la presencia de melatonina en las muestras. Al comparar los cromatogramas de las muestras normales con los cromatogramas de las muestras fortificadas hubo una clara diferencia en las áreas bajo la curva obtenidas, ya que

al adicionar melatonina extra a las muestras se produjo una sobresaturación que resultó en el ensanchamiento de los picos.

## **B. Linealidad**

La linealidad es un aspecto fundamental dentro de la validación de un método analítico, ya que permite confirmar que existe una relación directa y proporcional entre la concentración del analito y la respuesta instrumental (Kumar et al., 2023)

La linealidad del método se evaluó mediante la curva de calibración de las soluciones estándar de melatonina, a través de la regresión lineal y el coeficiente de correlación obtenido del análisis ( $R^2$ ). El ICH no establece valores específicos para la linealidad, por lo que otras entidades como la USP y la AOAC sugieren que el coeficiente de correlación presente un valor  $\geq 0.99$ , ya que esto significa que existe una excelente correlación entre la concentración de la solución y la respuesta analítica (AOAC, 2016). Como puede observarse en el Cuadro No. 7, el valor de  $R^2$  obtenido fue de 0.9932. Este valor se encontró dentro del rango de análisis aceptable, lo cual indica una excelente correlación lineal dentro del rango de concentraciones evaluado.

## **C. Exactitud**

La exactitud corresponde a un parámetro de validación que se utiliza para evaluar qué tan cercanos se encuentran los resultados obtenidos respecto al valor real o teórico, obteniéndolo a través de un porcentaje de recuperación (ICH, 2023). Asimismo, según la AOAC, los límites permitidos respecto a un porcentaje de recuperación se encuentran en un rango de 98-102% del valor obtenido (AOAC, 2016).

Haciendo énfasis en ello, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron ligeramente superiores al 100% (Cuadro No. 8). No obstante, este valor se encontró dentro del rango de aceptación establecido por la AOAC (2016), lo cual indica que el método analítico fue capaz de recuperar adecuadamente la melatonina presente en las soluciones. La proximidad

al 100% sugiere que no hubo pérdidas significativas del analito durante el procedimiento, lo cual es esencial para asegurar la confiabilidad y exactitud de los resultados.

#### **D. Precisión**

La precisión corresponde a un parámetro de validación que puede clasificarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproductividad (ICH, 2023). Sin embargo, en esta investigación únicamente se evaluó la repetibilidad y la precisión intermedia del método, ya que la reproducibilidad es un parámetro que requiere la evaluación del método mediante el ensayo en múltiples laboratorios, siendo un factor limitante en esta investigación.

La repetibilidad es un parámetro que se utiliza para medir la capacidad del método para producir resultados consistentes al momento de llevar a cabo múltiples mediciones bajo las mismas condiciones experimentales (ICH, 2023). En este contexto, la evaluación se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de variación (%CV) utilizando las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas analizadas el día 1.

De acuerdo con los criterios establecidos por la AOAC (2016), un %CV  $\leq 2.0\%$  se considera aceptable para este parámetro, y como puede observarse en el Cuadro No. 9, los %CV obtenidos se encontraron muy por debajo de este límite. Esto indica que la variabilidad entre las mediciones fue mínima, lo cual demuestra que el método es capaz de generar resultados consistentes bajo las mismas condiciones operativas.

Por su parte, la precisión intermedia se refiere a las variaciones que pueden presentarse dentro de los laboratorios, como lo pueden ser: diferentes días de análisis, diferentes analistas y diferentes equipos, entre otros aspectos (ICH, 2023). En este contexto, la precisión intermedia también se evaluó mediante el %CV utilizando las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas, pero analizadas en el día 2, con el fin de evaluar cómo se comporta el método bajo ciertas variaciones. Mediante el análisis en el segundo día también se obtuvieron %CV dentro del rango de aceptación permitido, ya que dichos valores fueron  $\leq 2.0\%$ .

Al comparar los %CV obtenidos en entre ambos días pudieron observarse leves diferencias en los resultados, ya que estos fueron ligeramente mayores en el día 2 para las concentraciones de 1.035 ppm y 103.5 ppm. Sin embargo, en ambos días de análisis los valores permanecieron considerablemente por debajo del límite aceptable. En términos generales, los promedios del %CV fueron de 0.2860% para la concentración de 1.035 ppm, 0.6503% para la concentración de 51.75 ppm y 0.6611% para la concentración de 103.5 ppm. Estos resultados indican que el método cumple con los criterios establecidos para la precisión intermedia, demostrando su confiabilidad bajo condiciones variables de análisis.

### **E. LOD y LOQ**

El LOD y LOQ corresponden a las concentraciones mínimas a las que el analito se puede ser detectado y cuantificado de manera fiable, respectivamente (ICH, 2023). Mediante el análisis se obtuvo un LOD de 0.00831 ppm, el cual representa la concentración más baja del analito que el método de cromatografía HPLC es capaz de detectar, pero que no de cuantificar con precisión (ICH, 2023). Esto quiere decir que, si se hubiera obtenido una concentración menor a dicho valor, el equipo no podría distinguirla del ruido de fondo, por lo que no se podría determinar con certeza si el analito está presente en la muestra. Respecto al LOQ, se obtuvo un valor de 0.02519 ppm, el cual representa la concentración más baja de analito que el método de cromatografía HPLC es capaz de cuantificar con una precisión y exactitud aceptables (ICH, 2023).

El cálculo de los valores de LOD y LOQ a partir de la curva de calibración, sugiere que el método posee una sensibilidad teórica elevada. Al comparar estos valores con los resultados obtenidos de cuantificación, se observó que ambos límites fueron considerablemente inferiores a la concentración más baja encontrada en las muestras, así como al estándar más bajo empleado en la curva de calibración (1.035 ppm). Esto indica un buen potencial del método para detectar concentraciones bajas de melatonina.

## **F. Robustez**

Para evaluar la robustez del método, se llevaron a cabo nuevamente las lecturas de las muestras, los estándares y la solución blanco, utilizando el mismo cromatógrafo HPLC y las mismas condiciones de análisis, pero empleando una columna diferente (Eclipse Plus). Esta columna fue seleccionada para esta investigación debido a su disponibilidad en el laboratorio y a su compatibilidad con las condiciones de análisis utilizadas. De acuerdo con lo establecido por la ICH (2023), esta variación se introdujo de forma intencionada con el objetivo de verificar que el desempeño del método no se viera comprometido, evaluando así su capacidad para tolerar modificaciones en los parámetros operativos sin afectar su fiabilidad.

Como puede observarse en el Cuadro No. 12, al reevaluar los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, precisión, LOD y LOQ utilizando la columna Eclipse Plus, se obtuvieron resultados equivalentes a los obtenidos con la columna Hypersil ODS, manteniéndose en todos los casos dentro de los rangos de aceptación permitidos. Los resultados obtenidos evidenciaron una alta consistencia entre ambas columnas, ya que no se observaron diferencias significativas entre ellas. Esta leve variación confirma la robustez del método y evidencia su capacidad para mantener un desempeño analítico confiable ante variaciones en el sistema.

## **G. Cuantificación de melatonina en las muestras**

La cuantificación de melatonina en cada producto se llevó a cabo con el propósito de verificar si la cantidad contenida coincidía con lo declarado en la etiqueta nutricional, considerando el rango de aceptación establecido para un principio activo.

Inicialmente se analizaron las muestras de gomitas de ambos lotes de la marca A, las cuales indicaban en su etiqueta nutricional que por cada gomita había 4 mg de melatonina. Al llevar a cabo el análisis de las muestras, se obtuvo un %R de 109.42% para el lote 1 y de 109.45% para el lote 2. En el caso de las muestras de la marca B, estas indicaban en su etiqueta nutricional que por cada 3 gomitas había 10 mg de melatonina, dando un valor

individual de 3.33 mg de melatonina por gomita. Al llevar a cabo el análisis, se obtuvo un %R de 93.73% para el lote 1 y de 93.45% para el lote 2.

La concentración de melatonina detectada en ambas marcas de gomitas se encontró dentro del rango aceptable establecido por la USP para productos no oficiales, es decir, aquellos que no cuentan con una monografía específica. Esto se debe a que, de acuerdo con lo indicado por la USP, los ingredientes activos en estos productos pueden presentar una variación del 90-110% respecto al valor declarado en la etiqueta (USP, 2023). Por lo tanto, dado a que ninguna de las muestras analizadas superó estos límites, se concluye que ambas marcas cumplieron con las cantidades adecuadas de melatonina para su comercialización.

Haciendo énfasis en todo lo mencionado anteriormente, como conclusión de esta investigación puede establecerse que se cumplieron con los objetivos propuestos, ya que se consiguió diseñar y validar el método por cromatografía HPLC para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala. Asimismo, mediante la evaluación de la robustez se confirmó la hipótesis de investigación planteada al inicio del estudio, concluyendo que el método por HPLC corresponde a un método de análisis idóneo para la cuantificación de melatonina en este tipo de suplementos dietéticos.

En caso de que se desee replicar esta investigación, se recomienda evaluar la reproducibilidad del método. Esto se debe a que dicho parámetro se encarga de evaluar la capacidad que este posee para producir resultados consistentes en distintos laboratorios, por lo que es un parámetro importante para asegurar que los resultados son confiables en distintos entornos operativos. Asimismo, se recomienda utilizar el método diseñado como referencia para futuras investigaciones en otro tipo de gomitas, a manera de corroborar su utilidad práctica en otras matrices.

## VIII. Conclusiones

1. Se diseñó un método analítico mediante cromatografía HPLC, para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala, cuyos resultados fueron válidos y confiables.
2. Se demostró que el método por cromatografía HPLC es un método confiable para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita que se comercializan en Guatemala.
3. De los valores obtenidos para los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección, límite de cuantificación y robustez, se demostró que el método es adecuado para la cuantificación de melatonina en suplementos dietéticos en forma de gomita. Por lo tanto, el método cumple con los criterios establecidos para su aplicación en el análisis de melatonina.
4. El porcentaje de recuperación de melatonina por gomita en las muestras de la marca A, fue de 109.42% para el lote 1 y de 109.45% para el lote 2, mientras que el porcentaje de recuperación de melatonina por gomita en las muestras de la marca B fue de 93.73% para el lote 1 y de 93.45% para el lote 2.
5. Los porcentajes de recuperación obtenidos para la marca A y B se encontraron dentro del rango de variación aceptable para un principio activo según los criterios establecidos por la USP. Esto indica que ambas marcas cumplen con las cantidades adecuadas de melatonina para su comercialización.

## **IX. Recomendaciones**

- 1.** Dado a que la reproducibilidad no fue evaluada en el presente estudio, y debido a que este parámetro representa un aspecto importante dentro de la validación analítica, se recomienda incluirla en futuros trabajos a manera de verificar que los resultados sean consistentes al ser analizados en distintos laboratorios.
- 2.** Utilizar el método diseñado como referencia para futuras investigaciones en otro tipo de gomitas, a manera de corroborar su utilidad práctica en otras matrices.
- 3.** Si bien en el presente estudio se evaluó la robustez mediante el uso de dos columnas cromatográficas diferentes, se recomienda ampliar esta evaluación incluyendo otros factores críticos del sistema, como variaciones en la temperatura, ligeros ajustes en la proporción de la fase móvil y, en caso de utilizarse un tampón, el pH del mismo. Esto permitirá comprobar con mayor profundidad la capacidad del método para mantenerse confiable y consistente ante cambios operacionales comunes en entornos analíticos reales.

## X. Bibliografía

1. Ahmad SB, Ali A, Bilal M, Rashid SM, Wani AB, Bhat RR, Rehman MU. (2023) Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders. *Cell Mol Neurobiol.* 43(6), 2437-2458. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9907215/>
2. Agilent Technologies (2021) *Agilent 1100 Series Reference Manual*. [Archivo PDF].
3. Agilent Technologies (2019) *Consejos para el mantenimiento de su equipo de HPLC. Resolución de Problemas en HPLC: Troubleshooting*. [https://www.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/5\\_Trucos%20y%20consejos%20en%20la%20resoluci%C3%B3n%20de%20Problemas%20en%20HPLC.pdf](https://www.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/5_Trucos%20y%20consejos%20en%20la%20resoluci%C3%B3n%20de%20Problemas%20en%20HPLC.pdf)
4. Ali, AH. (2022) Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC): una revisión. *Ann Adv Chem.*, 6, 010-020. <https://www.advancechemjournal.com/articles/aac-aid1026.php>
5. Andrisano, V., Bertucci, C., Battaglia, A. & Cavrini, V. (2000) Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 23(1), 15-23. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10898150/>
6. AOAC (2023) *Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) for Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Produce, Beverages, Dairy Products, Eggs, Seafood, Meat Products, and Feed*. [Archivo PDF].
7. Argüelles, R. & y Bonmatí, M. (2015) Melatonina, la hormona de la noche. *Revista Eubacteria*, 33, 16-21. [https://www.um.es/eubacteria/cronobiologia\\_melatonina.pdf](https://www.um.es/eubacteria/cronobiologia_melatonina.pdf)
8. Cohen PA, Avula B, Wang YH, Katragunta K, Khan I. (2023) Quantity of Melatonin and CBD in Melatonin Gummies Sold in the US. *JAMA*. 329(16), 1401-1402. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10130950/>
9. Djaoudene O, Romano A, Bradai YD, Zebiri F, Ouchene A, Yousfi Y, Amrane-Abider M, Sahraoui-Remini Y, Madani K. (2023). A Global Overview of Dietary Supplements: Regulation, Market Trends, Usage during the COVID-19 Pandemic, and Health Effects. *Nutrients*. 15(15), 3320. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10421343/>

10. Edemann-Callesen, H., Keinke Andersen, H., Ussing, A., Virring, A., Jennum, P., Mol Debes, G, Laursen, T., Baandrup, L., Gade, C., Dettmann, J., Holm, J., Krogh, C., Birkefoss, K., Tarp, S. & Nicole Händel, M. (2023) Use of melatonin in children and adolescents with idiopathic chronic insomnia: a systematic review, meta-analysis, and clinical recommendation. *EClinicalMedicine*, 61: 102048. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10339185/>
11. Erland LA, Saxena PK. (2017) Melatonin Natural Health Products and Supplements: Presence of Serotonin and Significant Variability of Melatonin Content. *J Clin Sleep Med*. 13(2), 275-281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5263083/>
12. Gary, D. (2009) *Química Analítica*. [6 edición, McGraw Hill].
13. Givler D, Givler A, Luther PM, Wenger DM, Ahmadzadeh S, Shekoohi S, Edinoff AN, Dorius BK, Jean Baptiste C, Cornett EM, Kaye AM, Kaye AD. (2023) Chronic Administration of Melatonin: Physiological and Clinical Considerations. *Neurol Int.*, 15(1), 518-533. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10053496/>
14. Gutiérrez, H. & de la Vara, R. (2008) *Análisis y Diseño de Experimentos*. [2 edición, McGraw Hill].
15. ICH. (2023). *ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures - Step 5 - Revision 1*. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
16. Illnait, J. (2012) Melatonina: actualidad de una hormona olvidada. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43(3). <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226874007.pdf>
17. Kostoglou-Athanassiou I. (2013) Therapeutic applications of melatonin. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 4(1), 13-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3593297/>
18. Kumar, D., Ashok, M. & Sonali, K. (2023) HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW. *WORLD JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND MEDICAL RESEARCH*, 10(1), 233-241. <https://www.wjpmr.com/download/article/117122023/1704372424.pdf>
19. Manish Kumar Gupta, Aditya Ghuge, Manasi Parab, Yehya Al-Refaei, Anjali Khandare, Neha Dand, Nilkamal Waghmare (2022) A comparative review on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra Performance Liquid

- Chromatography (UPLC) & High-Performance Thin Layer, Chromatography (HPTLC) with current updates. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 35(4), 224-228 <https://intapi.sciendo.com/pdf/10.2478/cipms-2022-0039>
20. Lee, S., Smith, L., Tana, E., Cairns, R., Grunstein, R. & Cheung, J. (2023) Uso de melatonina en niños y adolescentes: una revisión de alcance de las perspectivas de los cuidadores. *Reseñas de medicamentos para dormir*, 70. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1087079223000643>
  21. Meng X, Li Y, Li S, Zhou Y, Gan RY, Xu DP, Li HB. (2017) Dietary Sources and Bioactivities of Melatonin. *Nutrients*. 7;9(4), 367. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5409706/>
  22. MSPAS (2022) *Norma Técnica 14 Versión 02-2022*. <https://medicamentos.mspas.gob.gt/index.php/legislacion-vigente/normas-tecnicas>
  23. National Center of Complementary and Integrative Health (NIH) (2024) *Melatonin: What You Need To Know*. <https://www.nccih.nih.gov/health/melatonin-what-you-need-to-know>
  24. Palacios, N., Manonelles, P., Blasco, R., Contreras, C., Franco, L., Gaztañaga, T., Manuz, B., de Teresa, C. & del Valle, M. (2019) Suplementos nutricionales para el deportista. Ayudas ergogénicas en el deporte - 2019. Documento de consenso de la Sociedad Española de Medicina del Deporte. *Arch Med Deporte* 2019, 36(1), 7-83. <https://archivosdemedicinadeldeporte.com/articulos/upload/Doc-consenso-ayudas-2019.pdf>
  25. Pérez, C., Díaz, E. & Rodríguez, F. (2014) Melatonina y su utilidad en la práctica diaria. *Medicina Interna de México*, 30(4), 419-424. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2014/mim144h.pdf>
  26. Perkin Elmer (2020) *Perkin Elmer LC300 Reference Manual*. [Archivo PDF].
  27. Pin, G. & Lluch, A. (2011) Melatonina: pros y contras de su empleo en atención primaria. *Anales de Pediatría Continuada*, 9(2), 121-127. <https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-melatonina-pros-contras-su-empleo-S1696281811700178>
  28. Pin, G., Merino, M., de la Calle, T., Hidalgo, M.I., Rodríguez, P.J., Soto, V. & Madrid, J.A. (2014) Consenso sobre el uso de melatonina en niños y adolescentes con

- dificultades para iniciar el sueño. *Anales de Pediatría*, 81(5), 328.e1-328.e9. <https://analesdepediatria.org/es-consenso-sobre-el-uso-melatonina-articulo-S1695403314001593>
29. Poza, J.J., Pujolb, M., Ortega-Albásc, J.J. & Romerod, O. (2018) Melatonina en los trastornos de sueño. *Neurología*, 37, 575-585. <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-avance-resumen-melatonina-los-trastornos-sueno-S0213485318302007>
30. Pranil T, Moongngarm A, Loypimai P. (2020) Influence of pH, temperature, and light on the stability of melatonin in aqueous solutions and fruit juices. *Heliyon*, 24;6(3), e03648. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7109460/>
31. Priya, K. (2022) Review Article on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method Development and Validation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 74(2), 23-29. <https://globalresearchonline.net/ijpsrr/v74-2/03.pdf>
32. Saavedra, H., García, M. & Arteaga, J. (2021) Las mil y una noches de la melatonina. *Revista colombiana de Endocrinología, Diabetes y Metabolismo*, 8(4), 429-442. <https://revistaendocrino.org/index.php/rcedm/article/download/725/937>
33. Salazar, A. (2005) *Evaluación de la calidad de suplementos dietéticos preparados a base de melatonina que se distribuyen en Guatemala*. [Tesis Licenciatura en Química Farmacéutica, Universidad Del Valle de Guatemala].
34. Sabri LA, Khasraghi AH, Sulaiman HT. (2018) Preparation and evaluation of oral soft chewable jelly containing flurbiprofen. *J Adv Pharm Technol Res.*, 13(4), 306-311. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9784038/>
35. Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2015). *Principios de análisis instrumental* [6 ed. Cengage Learning].
36. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougerou C. (2017) Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol*, 15(3), 434-443. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5405617/>
37. U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2022) *Introducción básica a los suplementos dietéticos*. <https://www.fda.gov/consumers/articulos-para-el-consumidor-en-espanol/introduccion-basica-los-suplementos-dieteticos>

38. U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2024) *Dietary Supplements*. <https://www.fda.gov/food/dietary-supplements>
39. U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2005) *Dietary Supplement Labeling Guide: Chapter IV. Nutrition Labeling*. <https://www.fda.gov/food/dietary-supplements-guidance-documents-regulatory-information/dietary-supplement-labeling-guide-chapter-iv-nutrition-labeling#4-22>
40. USP (2023) <795> *FAQs* [Archivo PDF].
41. Villafuerte, L. (2011) Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(1), 18-36. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57918590003.pdf>
42. Wade, L. (2011) *QUÍMICA ORGÁNICA*. [7 edición, Editorial Pearson].
43. Wierzejska RE. (2021) Dietary Supplements-For Whom? The Current State of Knowledge about the Health Effects of Selected Supplement Use. *Int J Environ Res Public Health*, 18(17). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8431076/>

## XI. Anexos

### A. Glosario

1. **Centrifugación:** método utilizado para separar sólidos de líquidos que poseen diferente densidad mediante una fuerza giratoria (Gary, 2009).
2. **Coefficiente de correlación ( $R^2$ ):** es una medida estadística que se encarga de cuantificar la dirección de la relación lineal entre dos variables (Gutiérrez & de la Vara, 2008).
3. **Compuesto apolar:** es un compuesto que posee átomos con una distribución homogénea de carga eléctrica, generando un dipolo eléctrico neto. Esto significa que la molécula no cuenta con un extremo positivo o negativo (Wade, 2011).
4. **Compuesto polar:** es un compuesto que posee átomos con una distribución desigual de carga eléctrica, generando un dipolo eléctrico. Esto significa que la molécula cuenta con un extremo positivo y otro negativo (Wade, 2011).
5. **Cromatograma:** corresponde al gráfico resultante de un análisis cromatográfico (Kumar et al., 2023).
6. **Desviación estándar:** es una medida que muestra la dispersión de un conjunto de datos respecto a su media (Gutiérrez & de la Vara, 2008).
7. **Dilución:** corresponde al proceso en el que se reduce la concentración de una solución al adicionar más solvente (Skoog et al., 2015).
8. **Efecto adverso:** es aquella reacción indeseada o perjudicial que se produce ante la administración de un medicamento (Illnait, 2012).
9. **Excipiente:** son sustancias inactivas que se agregan junto con el principio activo a una formulación farmacéutica, con el fin de facilitar la administración, estabilidad y absorción del producto, así como brindarle una apariencia agradable (Villafuerte, 2011).
10. **Eluir:** proceso en el que los componentes de una muestra son arrastrados a través de la columna cromatográfica por la fase móvil (Kumar et al., 2023).

- 11. Fase estacionaria:** corresponde al material sólido que se encuentra dentro de la columna cromatográfica y con el cual interactúan los compuestos de la muestra, mientras son arrastrados por la fase móvil. (Manish et al., 2022).
- 12. Fase móvil:** corresponde al líquido que fluye a través del equipo HPLC y se encarga de arrastrar los componentes de la muestra a través de la columna, donde ocurre la separación. (Manish et al., 2022).
- 13. Hipótesis de investigación (Hi):** corresponde a una suposición que realiza el investigador entorno a dos o más variables, respecto a lo que pretende encontrar o demostrar en el estudio (Gutiérrez & de la Vara, 2008).
- 14. Hipótesis nula (Ho):** corresponde a una afirmación en la que el investigador indica que no hay efecto, diferencia, o relación significativa entre las variables del estudio, contrarrestando la hipótesis de investigación (Gutiérrez & de la Vara, 2008).
- 15. Homogenizar:** es el proceso en el que se obtiene una mezcla uniforme, asegurando que todos sus componentes se encuentren distribuidos igualitariamente (Skoog et al., 2015).
- 16. Impureza:** se refiere a cualquier sustancia no deseada que se encuentre presente en un producto, afectando con ello su calidad (Villafuerte, 2011).
- 17. Incertidumbre de equipo o cristalería:** se refiere a la variabilidad o margen de error que se encuentra asociado con las mediciones que se ejecutan utilizando equipos o cristalería (Skoog et al., 2015).
- 18. Media:** es una medida estadística que indica el valor central de un conjunto de datos (Gutiérrez & de la Vara, 2008).
- 19. Método analítico:** corresponde a un procedimiento que se utiliza para identificar, cuantificar o caracterizar los componentes presentes en una muestra (Gary, 2009).
- 20. Pendiente de la curva:** es una medida que indica la tasa de cambio entre variables en un punto específico de la curva (Gutiérrez & de la Vara, 2008).
- 21. Principio activo:** es el componente de un medicamento que es responsable de brindar el efecto farmacológico esperado (Villafuerte, 2011).
- 22. Registro sanitario:** es un documento que autoriza y certifica a un producto farmacéutico para poder ser comercializados legalmente en un país (MSPAS, 2002).

- 23. Regresión lineal:** es un método estadístico que se utiliza para analizar la relación entre variables dependientes e independientes (Gutiérrez & de la Vara, 2008).
- 24. Sobrenadante:** se refiere a la porción líquida que permanece en la parte superior de la muestra luego de ser sometida al proceso de centrifugación (Gary, 2009).
- 25. Solución blanco:** es una muestra que no contiene el analito de interés, pero sí el solvente utilizado para el análisis. Esta solución se utiliza para identificar posibles interferencias o contaminantes que pudieran afectar el análisis (Gary, 2009).
- 26. Solución estándar:** consiste en una solución que posee una concentración conocida de analito y se prepara a partir de una solución estándar concentrada. Estas soluciones se utilizan para calibrar equipos y generar curvas de calibración que permitirán cuantificar el analito de interés en una muestra (Gary, 2009).
- 27. Tiempo de retención:** corresponde al tiempo que tarda un compuesto en atravesar la columna cromatográfica hasta el detector (Kumar et al., 2023).

## B. Fichas técnicas de los equipos

**Cuadro No. 14:** Especificaciones de la balanza analítica

Equipo	Especificación
Marca	Ohaus
Modelo	Pioneer
Incertidumbre	$\pm 0.0001$ g
Rango	0 – 210 g

(Ohaus, s.f.).

El cuadro anterior presenta las especificaciones de la balanza analítica empleada en el estudio. En la columna “Equipo” se enlistan las características técnicas consideradas para describir el instrumento y en la columna “Especificación” se detallan los datos correspondientes a cada una de estas características.

**Cuadro No. 15:** Especificaciones del cromatógrafo Agilent Series modelo 1100

<b>Equipo</b>	<b>Especificación</b>
Cromatógrafo	Agilent Series
Modelo	1100
Rango de presión	0 a 5800 psi (0 a 400 bar)
Bomba	Cuaternaria
Rango de flujo	0.001 a 10.0 mL/min
Detector	UV/VIS
Rango de longitud de onda	190 a 790 nm
Lámpara	Deuterio

(Agilent Series modelo 1100, s.f.).

El cuadro anterior presenta las especificaciones del cromatógrafo Agilent Series modelo 1100. En la columna “Equipo” se enlistan las características técnicas consideradas para describir el instrumento y en la columna “Especificación” se detallan los datos correspondientes a cada una de estas características.

**Cuadro No. 16:** Especificaciones de la columna Hypersil ODS

<b>Equipo</b>	<b>Especificación</b>
Marca	Hypersil ODS
Tipo	C18 Fase inversa
Dimensiones	200 x 2.1 mm
Tamaño de partícula	5 µm

(Hypersil ODS, s.f.).

El cuadro anterior presenta las especificaciones de la columna Hypersil ODS. En la columna “Equipo” se enlistan las características técnicas consideradas para describir el instrumento y en la columna “Especificación” se detallan los datos correspondientes a cada una de estas características.

**Cuadro No. 17:** Especificaciones de la columna Eclipse Plus

<b>Equipo</b>	<b>Especificación</b>
Marca	Eclipse Plus
Tipo	C18 Fase inversa
Dimensiones	4.6 x 100 mm
Tamaño de partícula	5 $\mu\text{m}$

(Eclipse Plus, s.f.).

El cuadro anterior presenta las especificaciones de la columna Eclipse Plus. En la columna “Equipo” se enlistan las características técnicas consideradas para describir el instrumento y en la columna “Especificación” se detallan los datos correspondientes a cada una de estas características.

### **C. Datos originales**

**Cuadro No. 18:** Cantidad de melatonina por gomita de las marcas utilizadas para este estudio

<b>Marca A (mg)</b>	<b>Marca B (mg)</b>
4.0	3.33

En el cuadro anterior se muestra la cantidad de melatonina por gomita indicada en la etiqueta nutricional de las marcas utilizadas para este estudio. La marca A indica que cada gomita cuenta con 4 mg de melatonina, mientras que la marca B indica que por cada 3 gomitas hay 10 mg de melatonina, correspondiendo a una cantidad por gomita de 3.33 mg.

**Cuadro No. 19:** Cantidad pesada de melatonina para la preparación de la solución madre

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad pesada (<math>\pm 0.0001</math> g)</b>
Melatonina	0.1035

En el cuadro anterior se muestra la cantidad pesada de melatonina para la preparación de la solución madre, a una concentración de 1000 ppm.

**Cuadro No. 20:** Peso individual de 10 gomitas de melatonina de ambos lotes de la marca A y B

Gomita No.	Peso de gomitas de la Marca A ( $\pm 0.0001$ g)		Peso de gomitas de la Marca B ( $\pm 0.0001$ g)	
	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)
1	2.9993	3.0335	3.1719	3.1339
2	2.9968	3.0118	3.1637	3.1903
3	2.9728	3.0538	3.1840	3.1635
4	3.0139	3.1228	3.2191	3.1983
5	3.0985	3.0667	3.1614	3.0941
6	2.9603	3.0030	3.1045	3.1243
7	3.0192	3.0988	3.1097	3.1377
8	3.1495	2.9349	3.1238	3.1099
9	3.0263	3.1079	3.1448	3.1079
10	2.9653	3.084	3.1238	3.0621

En el cuadro anterior se muestra el peso individual de 10 gomitas de melatonina de ambos lotes de la marca A y B.

**Cuadro No. 21:** Cantidad necesaria de cada gomita de melatonina para la preparación de las soluciones a 50 ppm.

Lote No.	Peso de gomitas de la Marca A ( $\pm 0.0001$ g)	Peso de gomitas de la Marca B ( $\pm 0.0001$ g)
1	1.9073	2.3457
2	1.8664	2.4175

En el cuadro anterior se muestra la cantidad necesaria de las gomitas de melatonina para la preparación de las soluciones a 50 ppm (equivalente a 2.5 mg de melatonina). Esta cantidad se determinó con base al peso promedio de las gomitas y la cantidad de melatonina declarada en la etiqueta nutricional (Cuadro No. 18).

**Cuadro No. 22:** Cantidad pesada de las gomas de melatonina para la preparación de las soluciones en triplicado a 50 ppm

Solución No.	Peso de gomas de la Marca A ( $\pm 0.0001$ g)		Peso de gomas de la Marca B ( $\pm 0.0001$ g)	
	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)
1	1.9122	1.8695	2.3575	2.4362
2	1.9172	1.8683	2.3362	2.4150
3	1.9086	1.8765	2.3560	2.4050

En el cuadro anterior se muestra la cantidad pesada de las gomas de melatonina de las marcas A y B, para la preparación de las soluciones en triplicado a 50 ppm. La columna “Solución No.” identifica el número asignado a cada una de las soluciones preparadas. Las siguientes columnas muestran el peso de las gomas de la marca A y de la marca B respectivamente, diferenciados por lote 1 y lote 2, para la preparación de las soluciones a dicha concentración. Estos pesos se efectuaron tomando en cuenta los datos indicados en el Cuadro No. 21.

**Cuadro No. 23:** Cantidad pesada de las gomas de melatonina para la preparación de las soluciones fortificadas en triplicado a 100 ppm

Solución No.	Peso de gomas de la Marca A ( $\pm 0.0001$ g)		Peso de gomas de la Marca B ( $\pm 0.0001$ g)	
	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)
1	1.9147	1.8740	2.3434	2.4634
2	1.9067	1.8631	2.3672	2.4720
3	1.9012	1.8620	2.3410	2.4332

En el cuadro anterior se muestra la cantidad pesada de las gomas de melatonina de las marcas A y B para la preparación de las soluciones fortificadas en triplicado a 100 ppm. La columna “Solución No.” identifica el número asignado a cada una de las soluciones preparadas. Las siguientes columnas muestran el peso de las gomas de la marca A y de la marca B respectivamente, diferenciados por lote 1 y lote 2 para la preparación de las

soluciones a dicha concentración. Estos datos fueron obtenidos según la información del Cuadro No. 21.

**Cuadro No. 24:** Cantidad pesada de melatonina para la preparación de las soluciones fortificadas en triplicado a 100 ppm

Solución No.	Peso de melatonina para la Marca A ( $\pm 0.0001$ g)		Peso de melatonina para la Marca B ( $\pm 0.0001$ g)	
	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)	Lote 1 (g)	Lote 2 (g)
1	0.0254	0.0256	0.0258	0.0255
2	0.0256	0.0251	0.0254	0.0258
3	0.0253	0.0254	0.0252	0.0252

En el cuadro anterior se muestra la cantidad pesada de las gomitas de melatonina de las marcas A y B para la preparación de las soluciones fortificadas en triplicado a 100 ppm. La columna “Solución No.” identifica el número asignado a cada una de las soluciones preparadas. Las siguientes columnas muestran el peso de las gomitas de la marca A y de la marca B respectivamente, diferenciados por lote 1 y lote 2. Estos pesos se efectuaron a manera de obtener soluciones doblemente concentradas.

**1. Datos obtenidos mediante un cromatógrafo Agilent Series modelo 1100 con una columna Hypersil ODS.**

**Cuadro No. 25:** Datos obtenidos de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar de melatonina, utilizando la columna Hypersil ODS

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	$t_R$ (min)	Área bajo la curva
1.035	1.859	1,056.39
	1.968	1,057.23
	1.976	1,054.86
	1.976	1,094.70
	1.967	1,055.88
	1.976	1,093.71
25.875	1.874	6,320.03

	1.99	6,201.29
	1.996	6,189.85
	2.019	6,209.83
	2.016	6,206.39
	2.02	6,199.75
51.75	1.9	13,925.0
	2.046	14,055.7
	2.055	14,149.0
	2.033	14,090.6
	2.05	13,953.8
	2.046	14,049.0
77.625	1.9	17,438.0
	2.053	17,940.8
	2.042	17,910.4
	2.037	17,958.0
	2.044	17,900.7
	2.041	17,954.0
103.5	1.91	23,073.8
	2.022	24,210.5
	2.034	24,298.7
	2.021	24,371.0
	2.037	23,361.3
	2.026	24,211.9

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar de melatonina, utilizando la columna Hypersil ODS. La columna “Concentración de las soluciones estándar”, muestra la concentración empleada para cada solución. La columna “ $t_R$ ”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico. Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

**Cuadro No. 26:** Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Hypersil ODS

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	$t_R$ (min)	Área bajo la curva
	1.859	1,056.39

1.035	1.968	1,057.23
	1.976	1,054.86
51.75	1.900	13,925.0
	2.046	14,055.7
	2.055	14,149.0
103.5	1.910	24,073.8
	2.022	24,210.5
	2.034	24,298.7

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Hypersil ODS. La columna “Concentración de las soluciones estándar”, muestra la concentración empleada para cada solución. La columna “ $t_R$ ”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico. Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

**Cuadro No. 27:** Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar en el día 2, utilizando la columna Hypersil ODS

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	$t_R$ (min)	Área bajo la curva
1.035	1.976	1,094.7
	1.967	1,085.8
	1.976	1,093.7
51.75	2.033	14,090.6
	2.050	13,953.8
	2.046	14,049.0
103.5	2.021	24,371.0
	2.037	23,961.3
	2.026	24,211.9

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Hypersil ODS. La columna “Concentración de las soluciones estándar”, muestra la concentración empleada para cada solución. La columna “ $t_R$ ”, indica

el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico. Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

**Cuadro No. 28:** Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las muestras

Lote No.	Marca A		Marca B	
	t <sub>R</sub> (min)	Área bajo la curva	t <sub>R</sub> (min)	Área bajo la curva
1	1.995	13,139.7	2.004	11,191.6
	2.003	13,412.7	1.999	11,554.9
	1.998	13,255.9	2.002	11,441.4
2	1.993	13,221.9	1.988	11,396.9
	1.994	13,379.6	1.984	11,438.4
	1.991	13,170.9	1.986	11,220.3

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las muestras de ambos lotes de las marcas A y B. La columna “Lote No.” indica el número de lote analizado. La columna “t<sub>R</sub>”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico y la columna “Área bajo la curva” registra el valor del área obtenido para cada concentración, correspondientes a la marca A y B

**Cuadro No. 29:** Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las muestras fortificadas

Lote No.	Marca A		Marca B	
	t <sub>R</sub> (min)	Área bajo la curva	t <sub>R</sub> (min)	Área bajo la curva
1	1.906	19,810.2	1.952	20,983.0
	1.908	19,396.7	2.005	19,916.1
	1.937	19,396.9	1.949	20,369.9
2	1.929	19,606.9	1.921	19,115.9
	1.935	20,959.2	1.904	20,861.8
	1.933	19,964.8	1.908	20,442.6

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las muestras fortificadas de ambos lotes de las marcas A y B. La primera columna muestra el número de lote, mientras que las siguientes columnas indican el  $t_R$  y el área bajo la curva registrada para cada lectura. La columna “Lote No.” indica el número de lote analizado. La columna “ $t_R$ ”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico y la columna “Área bajo la curva” registra el valor del área obtenido para cada concentración, correspondientes a la marca A y B.

**Cuadro No. 30:** Datos obtenidos de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Hypersil ODS

Lectura No.	$t_R$ (min)	Área bajo la curva
1	1.892	25.8361
2	1.891	25.3893
3	1.898	24.0976
4	1.892	31.2141
5	1.890	26.3164
6	1.892	26.1415
7	1.897	25.5232
8	1.902	29.0634
9	1.902	32.0068
10	1.898	26.7942
11	1.873	47.9936
12	1.871	30.9983
13	1.879	32.4904
14	1.886	34.7645
15	1.902	31.8613
16	1.895	31.4651
17	1.890	29.1960
18	1.895	27.0656
19	1.909	29.3691
20	1.901	31.3339

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las veinte lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50), utilizando la columna Hypersil ODS. La columna “Lectura No.”, muestra el número de lectura analizada. La columna “ $t_R$ ”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico.

Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

**2. Datos obtenidos mediante un cromatógrafo Agilent Series modelo 1100 con la columna Eclipse Plus**

**Cuadro No. 31:** Datos obtenidos de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar de melatonina utilizando la columna Eclipse Plus

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	t <sub>R</sub> (min)	Área bajo la curva
1.035	1.821	1,060.40
	1.846	1,058.23
	1.939	1,064.86
	1.947	1,096.74
	1.948	1,054.81
	1.942	1,093.76
25.875	1.953	6,522.23
	1.954	6,201.26
	1.951	6,588.85
	1.951	6,509.82
	1.950	6,319.38
	1.954	6,399.67
51.75	1.960	13,924.0
	1.955	14,056.7
	1.959	14,150.0
	1.960	14,080.6
	1.957	13,953.3
	1.958	14,047.0
77.625	1.961	17,939.0
	1.958	17,940.8
	1.960	17,910.1
	1.960	17,957.0
	1.962	17,901.7
	1.960	17,954.0
103.5	1.957	23,073.7
	1.959	24,210.5

	1.961	24,297.7
	1.962	24,372.0
	1.964	23,361.2
	1.963	24,211.0

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar de melatonina, utilizando la columna Eclipse Plus. La columna “Concentración de las soluciones estándar”, muestra la concentración empleada para cada solución. La columna “ $t_R$ ”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico. Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

**Cuadro No. 32:** Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Eclipse Plus

<b>Concentración de las soluciones estándar (ppm)</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b>Área bajo la curva</b>
1.035	1.821	1,060.4
	1.846	1,058.2
	1.939	1,064.8
51.75	1.960	13,924.0
	1.955	14,056.7
	1.959	14,150.0
103.5	1.957	24,073.7
	1.959	24,210.5
	1.961	24,297.7

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Eclipse Plus. La columna “Concentración de las soluciones estándar”, muestra la concentración empleada para cada solución. La columna “ $t_R$ ”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico. Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

**Cuadro No. 33:** Datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Eclipse Plus

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	t <sub>R</sub> (min)	Área bajo la curva
1.035	1.947	1,096.7
	1.948	1,084.8
	1.942	1,093.7
51.75	1.960	14,080.6
	1.957	13,953.3
	1.958	14,047.0
103.5	1.962	24,372.0
	1.964	23,961.2
	1.963	24,211.0

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar de melatonina a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Eclipse Plus. La columna “Concentración de las soluciones estándar”, muestra la concentración empleada para cada solución. La columna “t<sub>R</sub>”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico. Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

**Cuadro No. 34:** Datos obtenidos de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Eclipse Plus

Lectura No.	t <sub>R</sub> (min)	Área bajo la curva
1	1.892	24.8262
2	1.888	24.3447
3	1.874	24.5972
4	1.878	25.1138
5	1.898	24.3464
6	1.895	25.5141
7	1.894	24.5232
8	1.901	24.6634
9	1.892	25.6062
10	1.898	24.7902

11	1.886	25.9534
12	1.895	24.9582
13	1.899	25.4704
14	1.871	25.1745
15	1.904	24.8653
16	1.872	26.2146
17	1.899	24.9055
18	1.894	24.3322
19	1.902	24.5975
20	1.901	24.3137

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos de las veinte lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50), utilizando la columna Eclipse Plus. La columna “Lectura No.”, muestra el número de lectura analizada. La columna “ $t_R$ ”, indica el tiempo de retención correspondiente a cada lectura obtenida durante el análisis cromatográfico. Finalmente, la columna “Área bajo la curva”, registra el valor del área obtenido para cada concentración.

## D. Cálculos

### 1. Concentración experimental de las soluciones de melatonina

#### a. Solución madre

$$0.1035(\pm 0.0001)g \text{ melatonina} * \frac{1,000 \mu g \text{ melatonina}}{0.001 g \text{ melatonina}} = 103,500 \mu g \text{ melatonina}$$

$$\frac{103,500(\pm 0.0001)\mu g \text{ melatonina}}{100 (\pm 0.05)mL \text{ solución}} = 1,035(\pm 5.0 * 10^{-4}) ppm$$

El cálculo anterior se efectuó para obtener la concentración experimental (ppm) de la solución madre, con base en la cantidad de melatonina pesada.

**b. Soluciones estándar**

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = \frac{1,035(\pm 5.0 * 10^{-4}) \text{ ppm} * 0.1(\pm 0.05) \text{ mL}}{100 (\pm 0.05) \text{ mL}} = 1.035(\pm 5.0 * 10^{-1}) \text{ ppm}$$

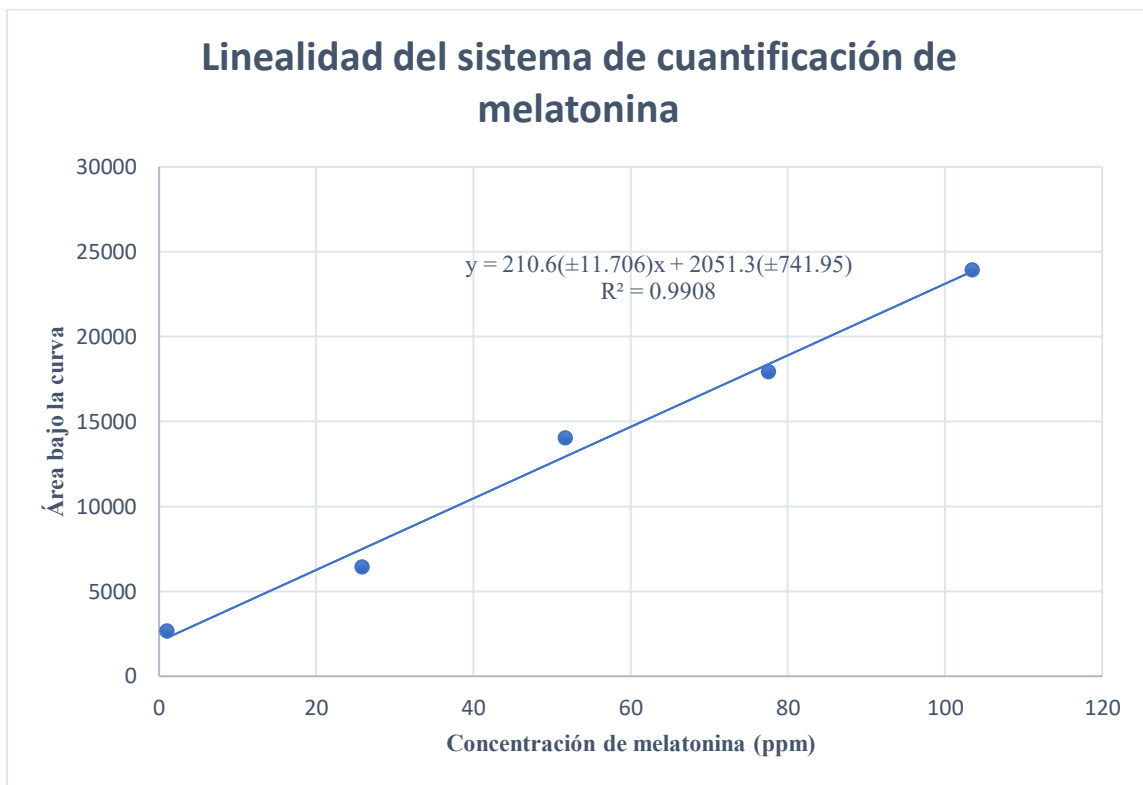
El cálculo anterior se efectuó para obtener la concentración experimental (ppm) de todas las soluciones estándar, sustituyendo en cada caso los valores respectivos para  $V_1$ .

**Cuadro No. 35:** Concentración experimental de las soluciones estándar de melatonina

<b>Solución estándar No.</b>	<b>Volumen de alícuota de la solución madre (mL)</b>	<b>Concentración experimental (<math>\pm 5.0 * 10^{-4}</math>) (ppm)</b>
1	0.1	1.035
2	2.5	25.86
3	5.0	51.75
4	7.5	77.63
5	10.0	103.5

En el cuadro anterior se muestran las concentraciones experimentales de las soluciones estándar de melatonina con base a la concentración experimental de la solución madre obtenida mediante el cálculo a. La columna “Solución estándar No.” indica el número de solución estándar analizada. La columna “Volumen de alícuota de la solución madre” indica el volumen de solución madre utilizada para la preparación de cada solución estándar. Finalmente, la columna “Concentración experimental” indica la concentración obtenida de cada solución estándar según el volumen de alícuota utilizado.

**Figura No. 12:** Linealidad del sistema de cuantificación de melatonina utilizando la columna Eclipse Plus



## 2. Evaluación de parámetros de validación

### a. Exactitud

$$\%R = \frac{CE}{CT} * 100$$

$$\%R = \frac{1.044 \text{ ppm}}{1.035 \text{ ppm}} * 100 = 100.87\%$$

El cálculo anterior se efectuó para evaluar la exactitud del método, utilizando las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente. Se efectuó el mismo cálculo para evaluar la exactitud con ambas columnas. En cada caso se sustituyeron los valores respectivos.

**Cuadro No. 36:** Resultados de los porcentajes de recuperación (%R)

Tipo de columna	Estándar 1 (%R)	Estándar 3 (%R)	Estándar 5 (%R)
Hypersil ODS	100.87%	100.21%	100.06%
Eclipse Plus	100.93%	100.27%	100.12%

En el cuadro anterior se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación calculados para las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente, utilizando ambas columnas. Estos resultados fueron obtenidos mediante el cálculo a.

**b. Precisión**

**1) Repetibilidad**

**a) Desviación estándar ( $\sigma$ )**

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{2.8878 \text{ ppm}}{3 - 1}} = 1.20162 \text{ ppm}$$

El cálculo anterior se efectuó para calcular la desviación estándar de las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente. Para ello se utilizaron las áreas bajo la curva obtenidas de las lecturas en triplicado y el promedio de las mismas. Se efectuó el mismo cálculo para calcular la desviación estándar utilizando ambas columnas. En cada caso se sustituyeron los valores respectivos.

**Cuadro No. 37:** Resultados de las desviaciones estándar de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 1

Tipo de columna	Estándar 1 (ppm)	Estándar 3 (ppm)	Estándar 5 (ppm)
Hypersil ODS	1.20162	112.5192	113.318
Eclipse Plus	3.38027	113.571	112.9115

En el cuadro anterior se muestran los resultados de la desviación estándar calculada para las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente, utilizando ambas columnas. Estos resultados fueron obtenidos mediante el cálculo a).

**b) Coeficiente de variación (%CV)**

$$\%CV = \left( \frac{\sigma}{\bar{X}} \right) * 100$$

$$\%CV = \left( \frac{1.20162}{1056.16} \right) * 100 = 0.113\%$$

El cálculo anterior se efectuó para evaluar el coeficiente de variación de las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente, utilizando ambas columnas. Para ello se utilizó la desviación estándar obtenida mediante el cálculo a) y el promedio de las áreas bajo la curva de los estándares. En cada caso se sustituyeron los valores respectivos.

**Cuadro No. 38:** Resultados de los coeficientes de variación (%CV) de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 1

Tipo de columna	Estándar 1 (%CV)	Estándar 3 (%CV)	Estándar 5 (%CV)
Hypersil ODS	0.11377	0.80123	0.46837
Eclipse Plus	0.31854	0.80870	0.46669

En el cuadro anterior se muestran los resultados del coeficiente de variación calculado para las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente, utilizando ambas columnas. Estos resultados fueron obtenidos mediante el cálculo b).

## 2) Precisión intermedia

**Cuadro No. 39:** Resultados de las desviaciones estándar de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 2

Tipo de columna	Estándar 1 (ppm)	Estándar 3 (ppm)	Estándar 5 (ppm)
Hypersil ODS	4.83186	70.1283	206.546
Eclipse Plus	6.20897	65.9721	206.9934

En el cuadro anterior se muestran los resultados de la desviación estándar calculada para las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente, utilizando ambas columnas. Estos resultados fueron obtenidos mediante el cálculo a).

**Cuadro No. 40:** Resultados de los coeficientes de variación (%CV) de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas, analizadas en el día 2

Tipo de columna	Estándar 1 (%CV)	Estándar 3 (%CV)	Estándar 5 (%CV)
Hypersil ODS	0.4582	0.4993	0.8537
Eclipse Plus	0.5687	0.4703	0.8560

En el cuadro anterior se muestran los resultados del coeficiente de variación calculado para las soluciones estándar a tres distintas concentraciones (baja, media y alta): 1.035 ppm, 51.75 ppm y 103.5 ppm respectivamente, utilizando ambas columnas. Estos resultados fueron obtenidos mediante el cálculo b).

### c. Límite de detección (LOD)

$$LOD = \frac{3.3 * \sigma}{S}$$

$$LOD = \frac{(3.3 * 0.5625)}{223.34} = 0.00831 \text{ ppm}$$

El cálculo anterior se efectuó para evaluar el límite de detección del método, utilizando la desviación estándar de los resultados del área bajo la curva obtenidos de la

solución blanco metanol/agua (50:50) y la pendiente de la curva de calibración (Figura No. 11) utilizando la columna Hypersil ODS. Se efectuó el mismo cálculo para evaluar el LOD del método, utilizando los resultados obtenidos con la columna Eclipse Plus.

**d. Límite de cuantificación (LOQ)**

$$LOQ = \frac{10 * \sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{(10 * 0.5625)}{223.34} = 0.02519 \text{ ppm}$$

El cálculo anterior se efectuó para evaluar el límite de cuantificación del método, utilizando la desviación estándar de los resultados del área bajo la curva obtenidos de la solución blanco metanol/agua (50:50) y la pendiente de la curva de calibración (Figura No. 11) utilizando la columna Hypersil ODS. Se efectuó el mismo cálculo para evaluar el LOQ del método, utilizando los resultados obtenidos con la columna Eclipse Plus.

**Cuadro No. 41:** Resultados del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ) utilizando la solución blanco

Tipo de columna	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Hypersil ODS	0.00831	0.02519
Eclipse Plus	0.00864	0.02620

En el cuadro anterior se muestran los resultados del LOD y LOQ calculados utilizando la solución blanco metanol/agua (50:50), utilizando ambas columnas. Los resultados fueron obtenidos mediante los cálculos 3) y 4).

**3. Cuantificación de melatonina en muestras de gomitas**

**a. Concentración de melatonina de la muestra en balón de 100 mL**

$$y = 223.34(\pm 11.899)x + 1,015.7(\pm 754.24)$$

$$x = \frac{1,3139.7 - 1,015.7}{223.34}$$

$$x = 54.2849 \text{ ppm}$$

El cálculo anterior se efectuó para la marca A (muestra 1 del lote 1), utilizando la ecuación de la curva de calibración de las soluciones estándar de melatonina (Figura No. 11) y sustituyendo en el intercepto el área bajo la curva de la muestra. Se efectuó el mismo cálculo para obtener la concentración de melatonina en el balón de 100 mL utilizado para la preparación de las soluciones, para las tres muestras de ambos lotes de las marcas A y B, utilizando ambas columnas. Para los resultados obtenidos con la columna Eclipse Plus se utilizó la respectiva ecuación de la curva de calibración (Figura No. 12).

**Cuadro No. 42:** Resultados de la concentración de melatonina de la muestra en balón de 100 mL

Muestra No.	Marca A		Marca B	
	Lote 1 (ppm)	Lote 2 (ppm)	Lote 1 (ppm)	Lote 2 (ppm)
1	54.2849	54.6530	45.5625	46.4816
2	55.5073	55.3591	47.1888	46.6674
3	54.8052	54.4246	46.6808	45.6909

En el cuadro anterior se muestran los resultados de la concentración de melatonina de la muestra en balón de 100 mL. Estos resultados se obtuvieron mediante el cálculo a.

**b. Cantidad de melatonina de la muestra en balón de 100 mL**

$$50 \text{ mL solución} * \frac{54.2849 \text{ } \mu\text{g}}{\text{mL}} = 2,714.2473 \text{ } \mu\text{g} = 2.7142 \text{ mg}$$

El cálculo anterior se efectuó para la marca A (muestra 1 del lote 1), utilizando la concentración obtenida mediante el cálculo a y multiplicándola por los mL utilizados para la preparación de la solución. Se efectuó el mismo cálculo para obtener la cantidad de melatonina (mg) en el balón de 100 mL utilizado para la preparación de las soluciones de las tres muestras de ambos lotes de las marcas A y B, utilizando ambas columnas. En cada caso se sustituyeron los valores respectivos.

**Cuadro No. 43:** Resultados de la cantidad de melatonina de la muestra en balón de 100 mL

Muestra No.	Marca A		Marca B	
	Lote 1 (mg)	Lote 2 (mg)	Lote 1 (mg)	Lote 2 (mg)
1	2.7142	2.7326	2.2781	2.3241
2	2.7754	2.7680	2.3594	2.3334
3	2.7403	2.7212	2.3340	2.2845

En el cuadro anterior se muestran los resultados de la cantidad de melatonina de la muestra en balón de 100 mL para ambos lotes de la marca A y B. Estos resultados se obtuvieron mediante el cálculo b.

**c. Cantidad de melatonina en muestras de gomitas**

**1) Cantidad real de melatonina que contiene cada gomita**

$$\left(\frac{2.7142 \text{ mg melatonina}}{1.9122 \text{ g gomita}}\right) * \left(\frac{3.0517 \text{ g gomita}}{1 \text{ gomita}}\right) = 4.3317 \frac{\text{mg}}{\text{gomita}}$$

El cálculo anterior se efectuó para la marca A (muestra 1 del lote 1), dividiendo el resultado obtenido mediante el cálculo b entre el peso individual de la gomita utilizado para la preparación de la solución y multiplicándolo por el peso promedio de las 10 gomitas. Se efectuó el mismo cálculo para obtener la cantidad real de melatonina que contiene cada gomita para ambos lotes de las marcas A y B, utilizando ambas columnas. En cada caso se sustituyeron los valores respectivos.

**Cuadro No. 44:** Resultados de la cantidad real de melatonina en cada muestra

Muestra No.	Marca A		Marca B	
	Lote 1 (mg)	Lote 2 (mg)	Lote 1 (mg)	Lote 2 (mg)
1	4.3317	4.3649	3.0223	3.0750
2	4.4177	4.4242	3.1587	3.1143
3	4.3815	4.3305	3.0985	3.0619

En el cuadro anterior se muestran los resultados de la cantidad real de melatonina presente en cada muestra de gomita para ambos lotes de la marca A y B. Estos resultados se obtuvieron mediante el cálculo 1).

**2) Porcentaje de recuperación de melatonina en ambas marcas de gomitas**

$$\%R = \frac{CE}{CT} * 100$$

$$\%R = \frac{4.3769 \text{ mg}}{4.0 \text{ mg}} * 100 = 109.42\%$$

El cálculo anterior se efectuó para el lote 1 de la marca A, utilizando el promedio de los resultados obtenidos mediante el cálculo 1) y la cantidad de melatonina indicada en la etiqueta nutricional (4 mg). Se efectuó el mismo cálculo para obtener el porcentaje de recuperación de melatonina presente en ambos lotes de las marcas A y B, utilizando ambas columnas. En cada caso se sustituyeron los valores respectivos, donde la cantidad de melatonina por gomita indicada etiqueta nutricional de la marca B fue de 3.33 mg.

**Cuadro No. 45:** Resultados de los porcentajes de recuperación (%R) de melatonina en ambas marcas de gomitas

Marca A		Marca B	
Lote 1 (%R)	Lote 2 (%R)	Lote 1 (%R)	Lote 2 (%R)
109.42%	109.33%	93.73%	93.45%

En el cuadro anterior se muestra el porcentaje de recuperación de melatonina en ambos lotes de las marcas A y B. Estos resultados fueron obtenidos mediante el cálculo 2).

## E. Análisis Estadístico

**Cuadro No. 46:** Estadística descriptiva del peso individual de 10 gomitas de melatonina para ambos lotes de la marca A y B

Lote No.	Marca A			Marca B		
	Promedio de los pesos (g)	Desviación estándar de los pesos (g)	%CV de los pesos	Promedio de los pesos (g)	Desviación estándar de los pesos (g)	%CV de los pesos
1	3.0202	0.06033	2.00%	3.1508	0.03624	1.15%
2	3.0517	0.05739	1.88%	3.1322	0.04252	1.36%

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva del peso individual de 10 gomitas de melatonina de ambos lotes de las marcas A y B. la columna. Para ello se calculó el promedio de los pesos de las 10 gomitas, y, posteriormente, se calculó su respectiva desviación estándar y %CV con el fin de evaluar el grado de variación y uniformidad en los pesos de cada lote.

### 1. Estadística descriptiva de los datos obtenidos utilizando la columna Hypersil ODS.

**Cuadro No. 47:** Estadística descriptiva de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar, utilizando la columna Hypersil ODS

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.035	1.954	0.0466	1,068.80	19.6999
25.875	1.986	0.0562	6,221.192	48.8980
51.75	2.022	0.0601	14,037.183	84.1150
77.625	2.020	0.0588	17,850.3	203.316
103.5	2.008	0.0486	23,921.2	555.806

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar, utilizando la columna Hypersil ODS. Para ello se

calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 48:** Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Hypersil ODS

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	Promedio de la concentración encontrada (ppm)	Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.035	1.044	1.934	0.0653	1,056.2	1.2016
51.75	51.859	2.000	0.0870	14,043.2	112.5192
103.5	103.562	1.989	0.0684	24,194.3	113.3182

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Hypersil ODS. Para ello, inicialmente se calculó el promedio de la concentración encontrada. Posteriormente se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 49:** Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Hypersil ODS

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.035	1.973	0.0052	1,091.4	4.8319
51.75	2.043	0.0089	14,031.1	70.1283
103.5	2.028	0.0082	24,181.4	206.5459

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2,

utilizando la columna Hypersil ODS. Para ello, se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 50:** Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las muestras

Lote No.	Marca A				Marca B			
	Promedio del $t_R$ (min)	Desv. estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desv. estándar del área bajo la curva	Promedio del $t_R$ (min)	Desv. estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desv. estándar del área bajo la curva
1	1.999	0.004	13,269.4	137.002	2.002	0.0025	11,396.0	185.862
2	1.993	0.0015	13,257.5	108.801	1.986	0.0020	11,351.9	115.814
Promedio	1.996	0.0028	13,263.5	122.902	1.994	0.0023	11,374.0	150.838

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las muestras de ambos lotes de la marca A y B. Para ello, se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio. Finalmente, se calculó un promedio general de cada resultado obtenido.

**Cuadro No. 51:** Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las muestras fortificadas

Lote No.	Marca A				Marca B			
	Promedio del $t_R$ (min)	Desv. estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desv. estándar del área bajo la curva	Promedio del $t_R$ (min)	Desv. estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desv. estándar del área bajo la curva
1	1.917	0.0173	19,534.6	238.677	1.969	0.0315	20,423.0	535.428
2	1.932	0.0031	20,177.0	700.671	1.911	0.0089	20,140.1	911.412

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las muestras fortificadas de ambos lotes de la marca A y B. Para ello, se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 52:** Estadística descriptiva de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Hypersil ODS

Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.893	0.0097	25.696	0.5625

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Hypersil ODS. Para ello, se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 53:** Tabla ANOVA de la curva de calibración utilizando la columna Hypersil ODS

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
<b>Regresión</b>	1	$3.2866 \cdot 10^8$	$3.2866 \cdot 10^8$	352.25	$3.3020 \cdot 10^{-4}$
<b>Residuos</b>	3	$2.7991 \cdot 10^6$	$9.3303 \cdot 10^5$		
<b>Total</b>	4	$3.3146 \cdot 10^8$			

En el cuadro anterior se muestra la tabla ANOVA correspondiente a la curva de calibración obtenida utilizando la columna Hypersil ODS. Este análisis fue realizado mediante Microsoft Excel y muestra los valores de los grados de libertad, la suma de cuadrados, el promedio de los cuadrados, así como los valores de F y F crítico. Los resultados permiten evaluar la significancia estadística del modelo de regresión, evidenciando si existe una relación lineal significativa entre las concentraciones y las respuestas obtenidas.

**Cuadro No. 54:** Estadística descriptiva de la cantidad de melatonina encontrada en las muestras de gomitas de la marca A y B

Lote No.	Marca A		Marca B	
	Promedio de la cantidad encontrada (mg)	Desviación estándar de la cantidad encontrada (mg)	Promedio de la cantidad encontrada (mg)	Desviación estándar de la cantidad encontrada (mg)
1	4.3770	0.0432	3.0932	0.0684
2	4.3732	0.0474	3.0837	0.0273

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de la cantidad de melatonina encontrada en las muestras de gomitas de la marca A y B. Para ello, se calculó el promedio de la cantidad de melatonina encontrada para cada lote, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

## 2. Estadística descriptiva de los datos obtenidos utilizando la columna Eclipse Plus

**Cuadro No. 55:** Estadística descriptiva de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar utilizando la columna Eclipse Plus

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.035	1.941	0.0101	1,070.8	19.2675
25.875	1.952	0.0017	6,423.5	145.150
51.75	1.958	0.0019	14,035.3	83.5640
77.625	1.960	0.0013	17,933.8	22.8666
103.5	1.961	0.0026	23,921.0	555.789

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en sextuplicado de las soluciones estándar, utilizando la columna Eclipse Plus. Para ello se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 56:** Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Eclipse Plus

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	Promedio de la concentración encontrada (ppm)	Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.035	1.045	1.869	0.0622	1,061.2	3.3803
51.75	51.890	1.958	0.0026	14,043.6	113.5709
103.5	103.624	1.959	0.0020	24,193.9	112.9115

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 1, utilizando la columna Eclipse Plus. Para ello, inicialmente se calculó el promedio de la concentración encontrada. Posteriormente se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 57:** Estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Eclipse Plus

Concentración de las soluciones estándar (ppm)	Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.035	1.946	0.0032	1,091.8	6.2090
51.75	1.958	0.0015	14,026.9	65.9721
103.5	1.963	0.0010	24,181.4	206.9934

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas en triplicado de las soluciones estándar a concentraciones bajas, medias y altas en el día 2, utilizando la columna Eclipse Plus. Para ello, se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 58:** Estadística descriptiva de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Eclipse Plus

Promedio del $t_R$ (min)	Desviación estándar del $t_R$ (min)	Promedio del área bajo la curva	Desviación estándar del área bajo la curva
1.892	0.0103	24.9560	0.5517

En el cuadro anterior se muestra la estadística descriptiva de las lecturas de la solución blanco metanol/agua (50:50) utilizando la columna Eclipse Plus. Para ello, se calculó el promedio de los  $t_R$  y de las áreas bajo la curva obtenidas, así como la respectiva desviación estándar de cada promedio.

**Cuadro No. 59:** Tabla ANOVA de la curva de calibración utilizando la columna Eclipse Plus

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
<b>Regresión</b>	1	$2.9225 \cdot 10^8$	$2.9225 \cdot 10^8$	$3.2369 \cdot 10^2$	$3.7452 \cdot 10^{-4}$
<b>Residuos</b>	3	$2.7086 \cdot 10^6$	$9.0287 \cdot 10^5$		
<b>Total</b>	4	$2.9496 \cdot 10^8$			

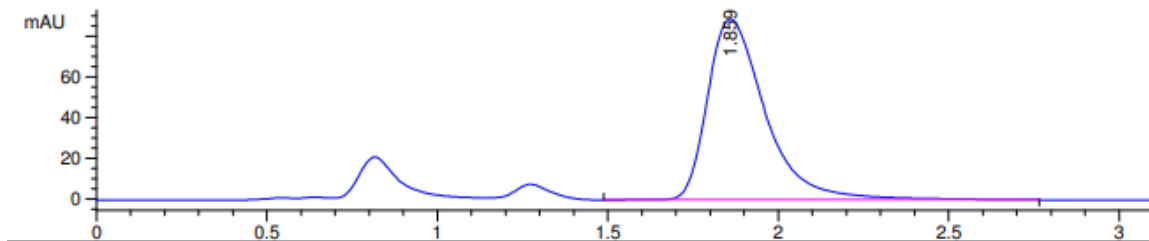
En el cuadro anterior se muestra la tabla ANOVA correspondiente a la curva de calibración obtenida utilizando la columna Eclipse Plus. Este análisis fue realizado mediante Microsoft Excel y muestra los valores de los grados de libertad, la suma de cuadrados, el promedio de los cuadrados, así como los valores de F y F crítico. Los resultados permiten evaluar la significancia estadística del modelo de regresión, evidenciando si existe una relación lineal significativa entre las concentraciones y las respuestas obtenidas.

## F. Cromatogramas

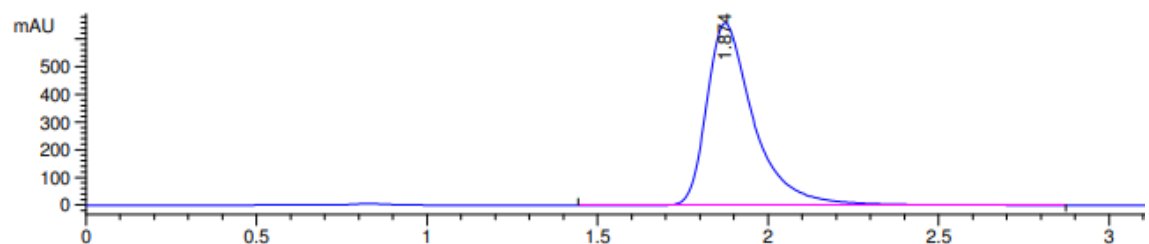
A continuación, se muestra un cromatograma de ejemplo para cada lectura:

## 1. Soluciones estándar de melatonina en el día 1, utilizando la columna Hypersil ODS

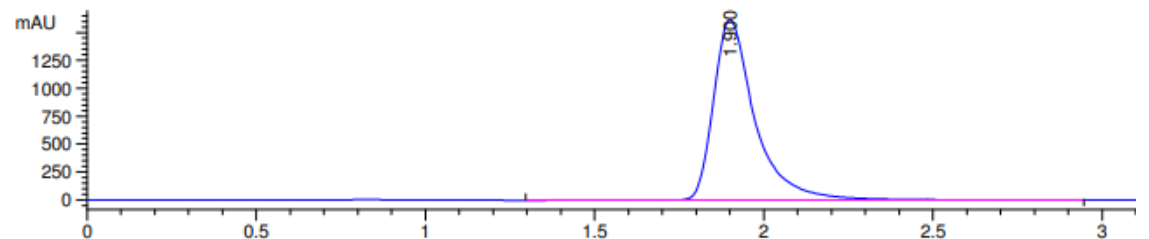
**Figura No. 13:** Cromatograma de la solución estándar a 1.035 ppm



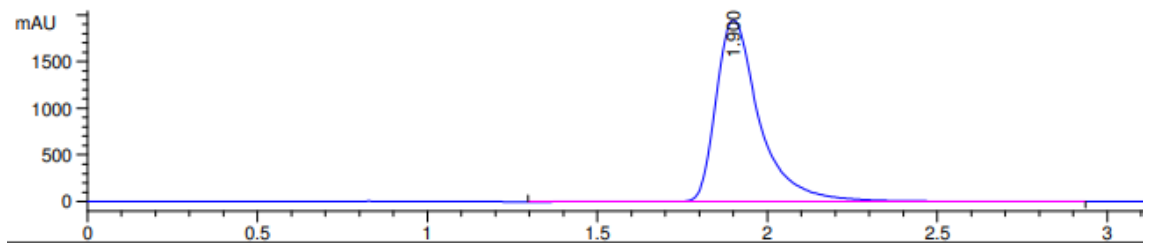
**Figura No. 14:** Cromatograma de la solución estándar a 25.875 ppm



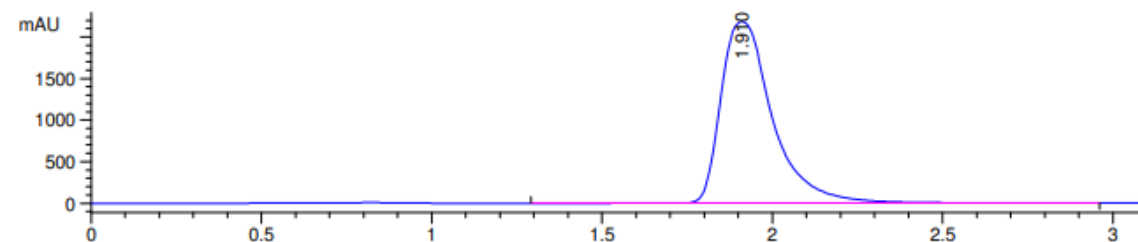
**Figura No. 15:** Cromatograma de la solución estándar a 51.75 ppm



**Figura No. 16:** Cromatograma la solución estándar a 77.625 ppm

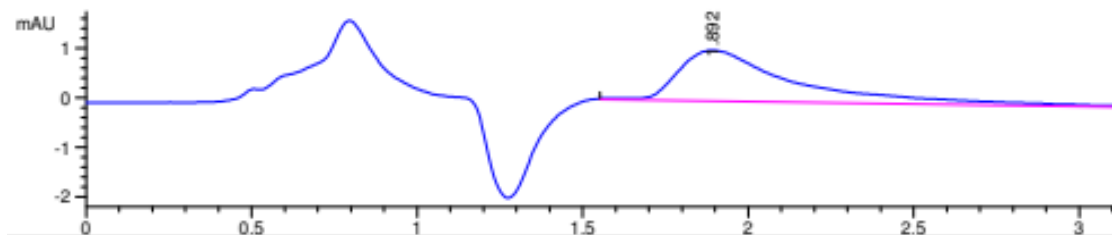


**Figura No. 17:** Cromatograma de la solución estándar a 103.5 ppm



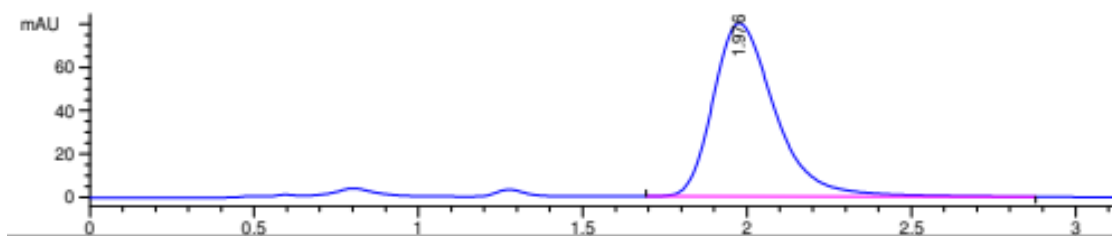
**2. Solución blanco metanol/agua (50:50), utilizando la columna Hypersil ODS**

**Figura No. 18:** Cromatograma de la solución blanco metanol/agua (50:50)

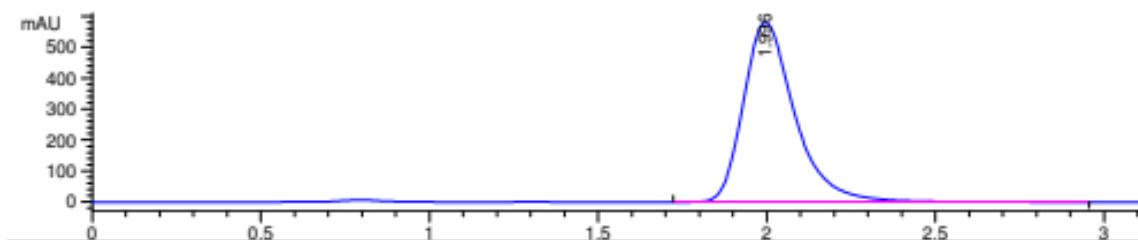


**3. Soluciones estándar de melatonina, utilizando la columna Eclipse Plus**

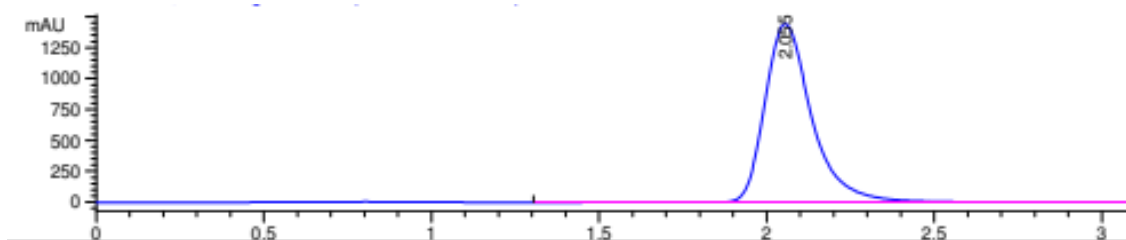
**Figura No. 19:** Cromatograma de la solución estándar a 1.035 ppm



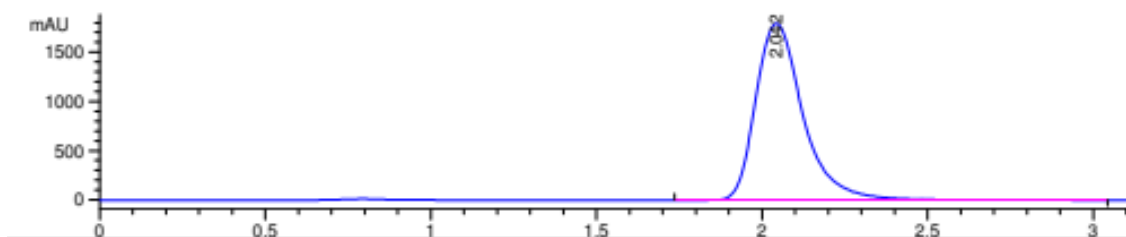
**Figura No. 20:** Cromatograma de la solución estándar a 25.875 ppm



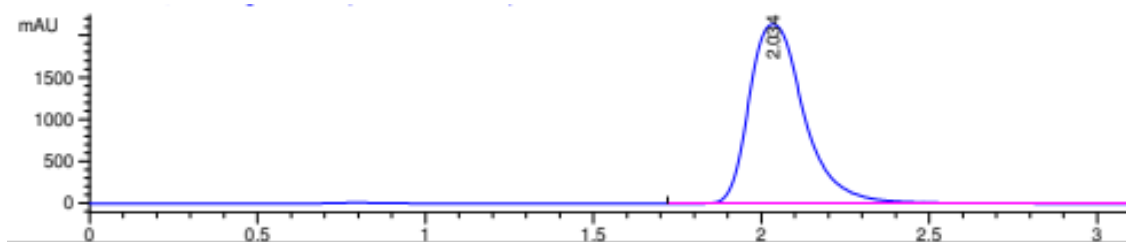
**Figura No. 21:** Cromatograma de la solución estándar a 51.75 ppm



**Figura No. 22:** Cromatograma la solución estándar a 77.625 ppm

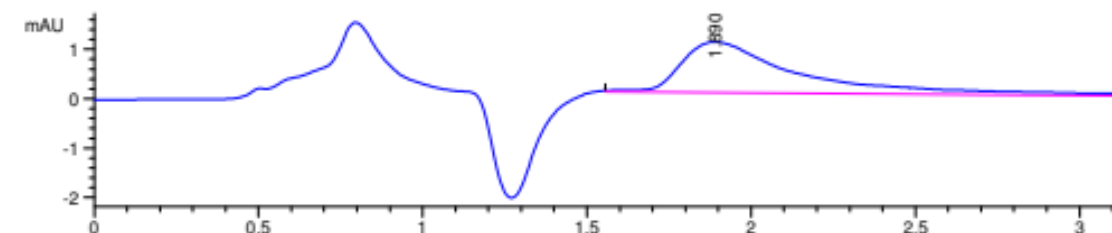


**Figura No. 23:** Cromatograma de la solución estándar a 103.5 ppm



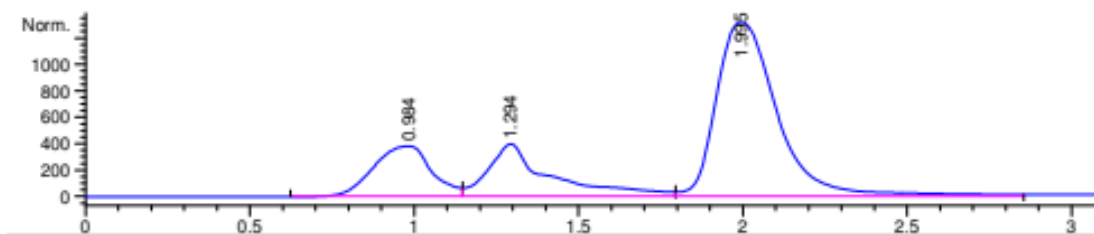
#### 4. Solución blanco metanol/agua (50:50), utilizando la columna Eclipse Plus

**Figura No. 24:** Cromatograma de la solución blanco metanol/agua (50:50)

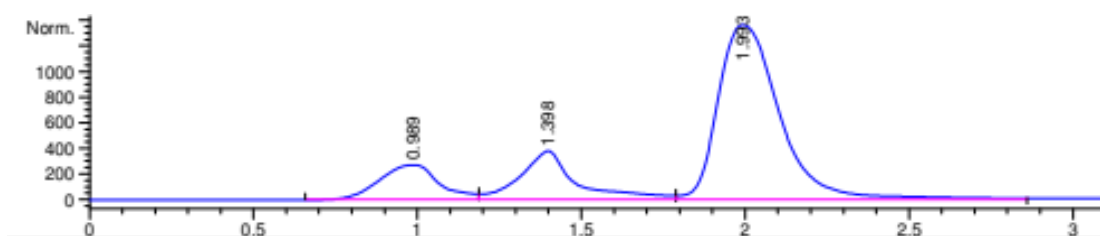


## 5. Muestras de gomitas de melatonina de la marca A

**Figura No. 25:** Cromatograma de las muestras del lote 1

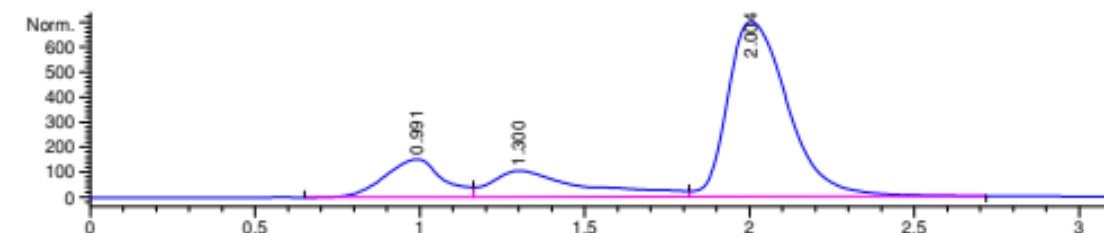


**Figura No. 26:** Cromatograma de las muestras del lote 2

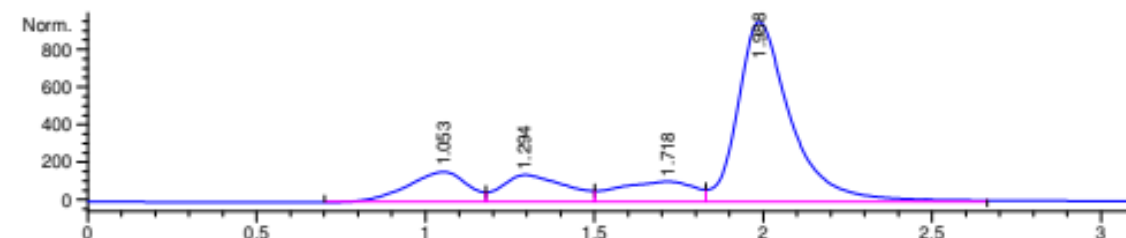


## 6. Muestras de gomitas de melatonina de la marca B

**Figura No. 27:** Cromatograma de las muestras del lote 1

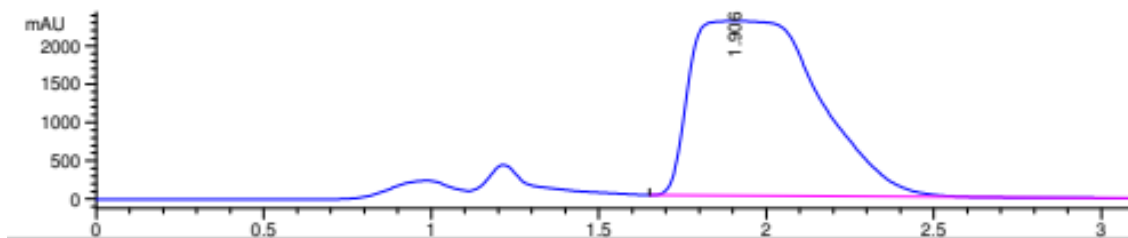


**Figura No. 28:** Cromatograma de las muestras del lote 2

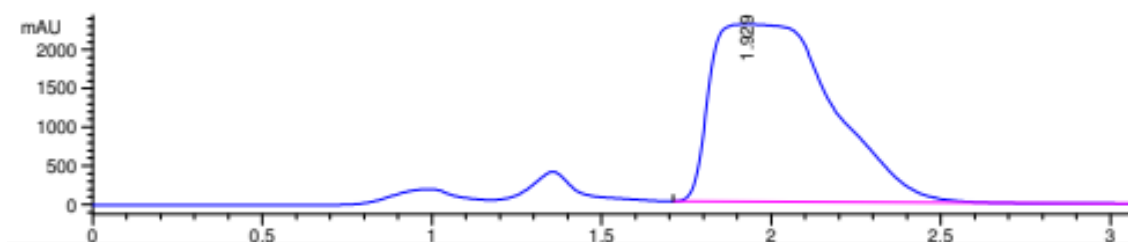


## 7. Muestras fortificadas de gomitas de melatonina de la marca A

**Figura No. 29:** Cromatograma de las muestras del lote 1

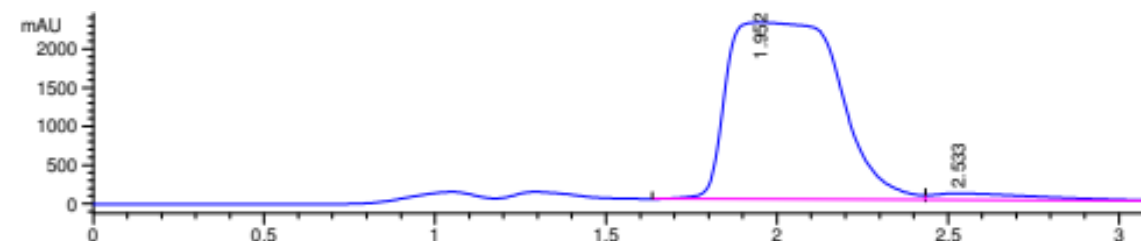


**Figura No. 30:** Cromatograma de las muestras del lote 2



## 8. Muestras fortificadas de gomitas de melatonina de la marca B

**Figura No. 31:** Cromatograma de las muestras del lote 1



**Figura No. 32:** Cromatograma de las muestras del lote 2

