

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR APLICABLE AL CONTROL DE LA CALIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO DE ACEROLA

Caridad Margarita García Peña^{1*}, Claudia Mora Rojas¹, Karine Elena Rodríguez Fernández¹, Vivian Martínez Espinosa¹, Susana Gómez Martínez², María Lidia González Sanabria¹, Antonio Nogueira Mendoza¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

²Empresa Laboratorio Farmacéutico 8 de Marzo.

*Autor de correspondencia: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave 26 No. 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes. Plaza de la Revolución. La Habana. Cuba. e-mail: caridadgp@infomed.sld.cu; caridad.garcia@cidem.cu

RESUMEN

La Acerola, debido a su potencial innegable como una de las mejores fuentes natural de vitamina C ha adquirido gran importancia en la industria farmacéutica. El objetivo del presente trabajo fue validar un método analítico por Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación del contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en extracto acuoso de Acerola (*Malpighia glabra* L), aplicable al control de la calidad y estudio de estabilidad. La validación del método analítico se realizó mediante la evaluación de los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud y precisión. El estudio de estabilidad se llevó a cabo, durante 6 meses, a tres lotes de extracto acuoso de Acerola obtenidos a nivel de laboratorio, envasados en frascos de plástico y vidrio, almacenados a temperatura ambiente 30 ± 2 °C y 70 ± 5 % de humedad relativa. Los resultados obtenidos en la validación del método fueron adecuados. Los resultados del estudio realizado, permitieron demostrar la estabilidad del extracto acuoso de Acerola. El método validado resultó específico, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas. Los resultados obtenidos evidenciaron la estabilidad del mismo durante el tiempo evaluado, en los dos envases empleados, sin diferencias significativas.

Palabras clave: Acerola, Extracto acuoso, Ácido ascórbico, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Validación, Estudio de estabilidad.

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD BY HPLC APPLICABLE TO THE STABILITY STUDY OF THE AQUEOUS EXTRACT OF ACEROLA

ABSTRACT

Acerola, because of its undeniable potential as one of the best natural sources of vitamin C, has acquired great importance in the pharmaceutical industry. The objective of the present work was to validate an analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) to determine the ascorbic acid (vitamin C) content in aqueous extract of Acerola (*Malpighia glabra* L), applicable to quality control and stability study. The validation of the analytical method was performed by evaluating the parameters of specificity, linearity, accuracy and precision. The stability study was carried out for six months on three lots of aqueous extract of Acerola obtained at laboratory level, packed in plastic and glass bottles, stored at room temperature 30 ± 2 ° C and $70 \pm 5\%$ moisture relative. The results obtained in the validation of the method were adequate. The results of the study, allowed demonstrating the stability of the aqueous extract of Acerola. The validated method was specific, linear, accurate and precise in the range of concentrations studied. The results obtained evidenced the stability of the same during the time evaluated, in the two containers used, without significant differences.

Keywords: Acerola, Aqueous extract, Ascorbic acid, High Resolution Liquid Chromatography, Validation, Stability study.

INTRODUCCION

La Acerola (*Malpighia glabra* L) es una especie arbustiva que se desarrolla en zonas de climas tropical y subtropical (1). Su característica principal es la de presentar un alto contenido de vitamina C (ácido ascórbico) (2). Es el fruto de Acerola uno de los de mayor contenido en vitamina C del mundo, los frutos inmaduros tienen mayor cantidad de esta vitamina que los maduros (3). También es rica en vitamina B₆, vitamina B₁, vitamina A, flavonoides y minerales esenciales (hierro, calcio, fósforo, potasio, magnesio) (4).

La vitamina C se considera uno de los más potentes antioxidantes naturales (1), es un micronutriente esencial necesario para el normal funcionamiento metabólico del organismo humano (5). Es una vitamina fundamental en la dieta humana, por lo que su determinación por técnicas sensibles y rápidas, es importante para evaluar su estabilidad en diferentes alimentos (6).

Actualmente la búsqueda de fuentes naturales de ácido ascórbico reviste gran interés por las características antioxidantes de la vitamina y las muchas funciones que se le atribuyen como beneficiosas para el hombre (6). La vitamina C se emplea en la prevención del escorbuto, en la

protección del organismo de los radicales libres, en la formación del colágeno, en la síntesis de hormonas esteroideas y en el metabolismo de la tirosina y del ácido fólico. Además esta vitamina facilita la absorción del catión hierro (II) (7).

Teniendo en cuenta que el fruto de Acerola es una fuente rica de obtención de vitamina C, el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), obtiene un extracto acuoso de Acerola, el cual está siendo investigado por el propio centro, con vista a su empleo como materia prima para el desarrollo de productos farmacéuticos.

En la literatura se reportan diferentes métodos para evaluar el contenido de vitamina C, por Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), debido a que es un método altamente sensible y específico.

Todo método analítico antes de emplearse en el control de la calidad y/o el estudio de estabilidad debe validarse previamente, porque es el proceso mediante el cual se obtienen las pruebas documentales que aseguran la confiabilidad del método (8).

Los estudios de estabilidad constituyen un eslabón importante en el desarrollo de ingredientes farmacéuticos activos, extractos y productos terminados, ya que permiten establecer el periodo de validez en su envase original y en las condiciones de almacenamiento especificadas (9).

Los objetivos del presente trabajo fueron validar un método analítico para la determinación del contenido de vitamina C en el extracto acuoso de Acerola y estudiar la estabilidad por vida de estante del extracto acuoso de Acerola.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó como muestra el extracto acuoso de Acerola (*Malpighia glabra* L) compuesto por frutos de acerola, metabisulfito de sodio y benzoato de sodio; elaborado en el departamento de tecnología farmacéutica, perteneciente al CIDEM, Cuba. Para ello se utilizó como material de partida el fruto de Acerola cosechado en la Estación experimental de plantas medicinales Dr. Juan Tomás Roig, perteneciente al CIDEM, Cuba. Se usó como sustancia de referencia química el ácido ascórbico (vitamina C), elaborado en el departamento de patrones, del CIDEM, Cuba, con una pureza de 99,8 %.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, procedentes de la Riedel –de Haen (España)

Validación del método analítico

Para la determinación del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) en el producto terminado se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, se utilizó un cromatógrafo (KNAUER) con detector

UV/VIS (KNAUER) ajustado a 254 nm, un dosificador (Loop) de 20 µL. La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Lichrosorb RP- 18 empacado con tamaño de partícula de 5 µm (250 - 4 mm). La fase móvil consistió en una mezcla desgasificada preparada de la siguiente manera: 1,1 g de hexanosulfonato de sodio, 24 mL de ácido acético y 5 mL de trietilamina en 1000 mL de agua destilada.; con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min.

Para la preparación de las muestras de extracto acuoso de acerola, se tomaron 2 mL de extracto acuoso y se trasvasaron a un matraz aforado de 100 mL, se adicionaron 20 mL de agua destilada, se disolvió se completó volumen con agua destilada. Mientras que para la sustancia de referencia química, se preparó una curva de calibración, a diferentes concentraciones que representaban 6,75; 10,8; 13,5; 16,2; 20,2 µg/mL en agua destilada.

Para la evaluación de los parámetros especificidad y exactitud se utilizaron placebos del producto en estudio. Para ello fue necesaria la preparación de un lote placebo a escala de laboratorio según la composición y método de elaboración propuesto.

La validación del método se realizó evaluando, los siguientes parámetros (8):

Especificidad

En la especificidad del método se analizó la sustancia de referencia química de ácido ascórbico, el placebo, la muestra de producto terminado y las muestras sometida a condiciones drásticas: hidrólisis ácida (HCl 3 N), hidrólisis básica (NaOH 3 N), temperatura (40 ° C), luz solar por 3 días, oxidación (5 mL de peróxido de hidrógeno)

Criterios: No se debe obtener señales del placebo, ni de los productos de degradación en la zona de elusión del ingrediente activo (8, 10-12)

Linealidad

Se prepararon soluciones de concentraciones conocidas de las sustancia de referencia química ácido ascórbico, que representan del 50 al 150 % de la concentración teórica del principio activo en el extracto acuoso. Se realizaron tres réplicas para cada nivel de concentración.

Criterios: ecuación de la recta: $y = bx + a$; coeficiente de correlación $r \geq 0,999$; coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,980$; desviación estándar relativa de la pendiente: $S_b(\text{rel}) \leq 2,0 \%$; coeficiente de variación de los factores de respuesta: $CV_f \leq 5,0 \%$ (8, 10-12)

Exactitud

En el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, preparando muestras con diferentes niveles de la concentración teórica del principio activo en el extracto: bajo, medio y alto correspondiente con el 80, 100 y 120 %, respectivamente.

Criterios: recuperación media entre un 98,0 – 102,0 %, la G calculada debe ser menor que G tabulada para un nivel de confianza de 95 % (8, 10-12)

Precisión

Se evaluó la precisión del método a través de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se estudió sobre la base de 9 determinaciones. Se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

El estudio de precisión intermedia se realizó por dos analistas, a un mismo nivel de concentración, y se realizó el análisis de diez réplicas de muestras homogéneas en el mismo laboratorio.

Criterios: Repetibilidad ($C.V \leq 2,0$). Precisión intermedia (t calculada debe ser menor t tabulada; F calculada debe ser menor F tabulada), para un nivel de confianza de 95 %. (8, 10-12)

Estudio de estabilidad

Las muestras se colocaron a temperatura ambiente 30 ± 2 °C y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR); se tomaron los valores de partida del tiempo cero como inicio del estudio, 3 y 6 meses. Se evaluaron en cada tiempo, los siguientes parámetros: características organolépticas, ph, valoración y conteo microbiano. Los análisis para cada parámetro evaluado se realizaron por triplicado en cada tiempo, se calculó la media y la desviación estándar (DS).

Con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos transcurridos los 6 meses, se realizó la comparación estadística a través de la prueba de t- Student a las muestras de extracto acuoso de Acerola, envasadas en frascos plásticos y de vidrio de 120mL ámbar, almacenadas a temperatura ambiente. Para ellos se empleó el lote 003, y se realizaron seis réplicas de cada uno (9)

Criterio de aceptación: t calculada \leq t tabulada.

RESULTADOS

Validación del método analítico

La figura 1 muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método.

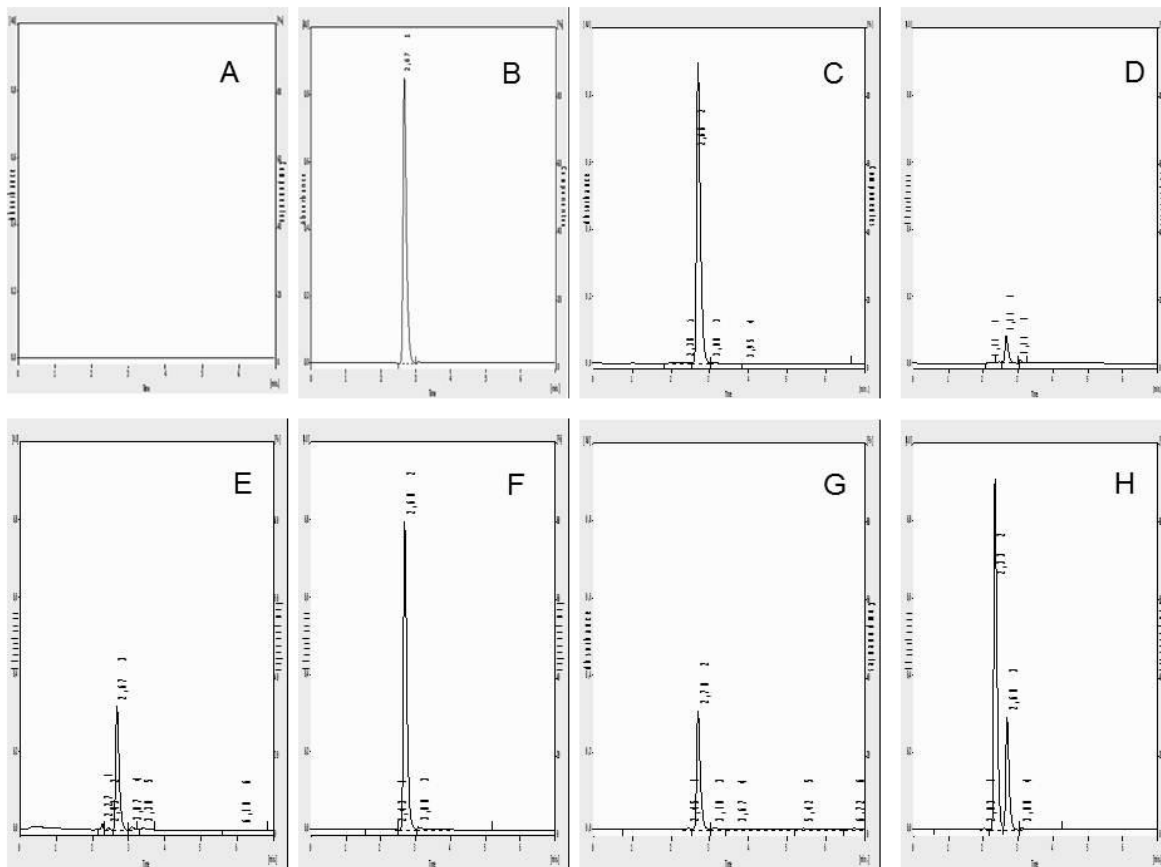


Figura 1. Estudio de especificidad del método. A- Cromatograma del placebo. B- Cromatograma de la sustancia de referencia química de ácido ascórbico. C- Cromatograma de la muestra de extracto acuoso de Acerola. D- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica. E- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida. F- Cromatograma de la muestra sometida a luz. G- Cromatograma de la muestra sometida a temperatura. H- Cromatograma de la muestra sometida a oxidación.

En la tabla 1, se muestran los resultados del estudio de linealidad.

Tabla 1. Resultados estadísticos del estudio de linealidad

Parámetros	Resultados	Criterio de Aceptación
Ecuación de la recta	$y = 46,098 x + 6,035$	$y = bx + a$
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,9995$	$r \geq 0,999$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0,9990$	$r^2 \geq 0,980$
Significación estadística de la varianza de la pendiente (b)		
Desviación estándar relativa de la pendiente	$Sb \text{ rel} = 1,75 \%$	$Sb \text{ rel} \leq 2,0 \%$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta		
Coefficiente de variación del factor de respuesta	$CVf = 3,46 \%$	$CVf \leq 5,0 \%$

Los resultados obtenidos en el análisis de la exactitud del método, se reportan en la tabla 2.

Tabla 2. Exactitud del método

Niveles	Recuperación (%)	Resultados		Criterio de aceptación
80%	99,50	Rm = 99,73 % CV = 0,38 %	Rm = 99,75 % CV = 0,26 %	98,0 – 102,0 % CV ≤ 2,0 %
	99,53			
	100,18			
100%	99,90	Rm = 99,87 % CV = 0,17 %	t cal = 1,540 t tab = 2,306	t exp. ≤ t tab.
	99,68			
	100,02			
120%	99,43	Rm = 99,66 % CV = 0,24 %	G cal = 0,425 G tab = 0,797	G exp. ≤ G tab.
	99,91			
	99,63			

En el estudio de la repetibilidad realizado a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de diez réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (0,84 %), lo que demuestra la buena precisión del método según el límite para los métodos cromatográficos: CV ≤ 2,0%.

Los resultados del estudio de la precisión intermedia aparecen en la tabla 3.

Tabla 3. Precisión intermedia

Niveles	Analista 1 (mg/mL)			Analista 2 (mg/mL)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3		
80%	18,5	18,5	18,5	18,5	17,8	17,8		
	18,4	18,2	18,2	18,2	18,2	18,3		
	18,1	18,3	18,9	18,0	17,8	18,0		
100%	22,1	22,1	22,8	22,2	22,1	22,7		
	22,4	22,6	21,9	22,7	21,7	22,6		
	22,6	22,5	22,7	22,6	22,2	22,5		
120%	26,4	26,3	25,9	26,2	25,7	25,7		
	26,3	26,7	26,7	26,0	25,9	26,0		
	26,9	26,9	26,4	25,7	26,4	26,5		
Análisis Estadístico								
Prueba de Fischer por analistas $F_{tab(8/8; 0,05)} = 3,44$		Prueba de Fischer por días $F_{tab(5/5; 0,05)} = 5,05$				Criterio de Aceptación $F_{exp} \leq F_{tab}$		
80	1,07	80	1/2	2/3	1/3			
100	1,15	100	1,23	1,87	1,54			
120	1,18	120	2,79	2,42	2,16			
Prueba de Student por analistas $t_{tab(16; 0,05)} = 2,12$		Prueba de Student por días $t_{tab(10; 0,05)} = 2,22$				Criterio de Aceptación $t_{exp} \leq t_{tab}$		
80	1,91	80	1/2	2/3	1/3			
100	0,36	100	1,21	0,89	1,04			
120	1,29	120	0,99	0,75	1,39			
Coeficientes de variación (%)						Criterio de Aceptación $CV \leq 2,0 \%$		
Niveles	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2			Día 3
80	0,93	0,68	1,55	1,13	1,05			1,14
100	0,92	0,96	1,79	0,96	0,98			0,36
120	0,99	0,94	1,25	0,79	1,13	1,27		
Niveles	Analista 1		Analista 2		Niveles			
80	1,23		1,30		1,56			
100	1,30		1,43		1,37			
120	1,17		1,09		1,47			

Estudio de estabilidad

En las tablas 4 y 5, aparecen los resultados del estudio de estabilidad realizado al extracto acuoso de Acerola, envasado en frascos de plástico y vidrio respectivamente, almacenados a temperatura ambiente 30 ± 2 °C y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR).

Tabla 4. Estabilidad vida de estante del extracto acuoso de Acerola en frasco plástico

Parámetros	Tiempo (meses)	Lotes			Criterio de aceptación
		001	002	003	
Característica Organoléptica	0	Responde	Responde	Responde	Solución con color y olor característico
	3	Responde	Responde	Responde	
	6	Responde	Responde	Responde	
pH	0	$3,93 \pm 0,03$	$3,92 \pm 0,05$	$3,89 \pm 0,03$	2,5 - 5,5.
	3	$3,84 \pm 0,04$	$3,85 \pm 0,02$	$3,81 \pm 0,04$	
	6	$3,72 \pm 0,02$	$3,70 \pm 0,03$	$3,65 \pm 0,02$	
Valoración (mg/mL)	0	$21,2 \pm 0,41$	$20,8 \pm 0,41$	$20,3 \pm 0,26$	No menos de 2,5mg/mL
	3	$20,9 \pm 0,36$	$20,6 \pm 0,38$	$20,1 \pm 0,39$	
	6	$20,6 \pm 0,26$	$20,5 \pm 0,27$	$20,0 \pm 0,44$	
Conteo microbiano	0	Cumple	Cumple	Cumple	CB: $\leq 10^4$ UFC/g CH: $\leq 10^3$ UFC/g Ausencia de patógenos
	6	Cumple	Cumple	Cumple	

Leyenda: X media \pm DS

Tabla 5. Estabilidad vida de estante del extracto acuoso de Acerola en frasco de vidrio

Parámetros	Tiempo (meses)	Lotes			Criterio de aceptación
		001	002	003	
Característica Organoléptica	0	Responde	Responde	Responde	Solución con color y olor característico
	3	Responde	Responde	Responde	
	6	Responde	Responde	Responde	
pH	0	3,93 ± 0,01	3,92 ± 0,04	3,89 ± 0,03	2,5 - 5,5.
	3	3,89 ± 0,03	3,90 ± 0,02	3,86 ± 0,04	
	6	3,84 ± 0,04	3,85 ± 0,03	3,81 ± 0,02	
Valoración (mg/mL)	0	21,2 ± 0,44	20,8 ± 0,37	20,3 ± 0,43	No menos de 2,5mg/mL
	3	21,1 ± 0,32	20,5 ± 0,43	20,2 ± 0,35	
	6	20,8 ± 0,28	20,3 ± 0,36	19,9 ± 0,43	
Conteo microbiano	0	Cumple	Cumple	Cumple	CB: ≤ 10 ⁴ UFC/g CH: ≤ 10 ³ UFC/g Ausencia de patógenos
	6	Cumple	Cumple	Cumple	

Leyenda: X media ± DS

En la tabla 6, se muestran los resultados de la comparación estadística realizada a los 6 meses, a las muestras de extracto acuoso de Acerola envasadas en frascos plásticos y de vidrio.

Tabla 6. Comparación entre envases

Muestras	F. Plástico	F. Vidrio
1	20,01	19,61
2	19,97	19,77
3	19,86	20,26
4	20,54	20,12
5	20,16	19,67
6	19,67	19,77
X media	20,04	19,87
DSR	0,27	0,24
CV	1,35	1,20
t calculada = 0,04		
t tabulada (11;0,05) = 2,20		

DISCUSIÓN

Validación del método analítico

Especificidad.

Como se puede apreciar, en la figura 1, en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo (A), no se observa ninguna señal en la zona de interés, al ser comparado con la obtenida para la sustancia de referencia química (B) y la muestra del extracto acuoso de Acerola (C), lo cual indica que los excipientes no interfieren en la determinación de la vitamina C.

En cuanto a las muestras sometidas a condiciones drásticas de hidrólisis básica, ácida, luz, temperatura y oxidación (D, E, F, G, H) respectivamente, se observa una disminución de la altura del pico del principio activo principalmente en las muestras sometidas a hidrólisis básica, ácida y temperatura, con la aparición de picos secundarios en las muestras sometidas a oxidación. Sin embargo, en las muestras expuestas a la luz, no se evidenció disminución en la altura del pico del principio activo. Estos resultados se corresponden con lo reportado en la literatura acerca de los factores que favorecen la degradación de la vitamina C, ya que las condiciones en las cuales se obtuvieron los productos de degradación coinciden con las planteadas por Torregrosa y Rodríguez sobre la sensibilidad de la vitamina C frente a la oxidación, la temperatura y la luz, y su inestabilidad en medio ácido y básico (5, 13).

Por lo que, se comprobó la especificidad del método al no existir interferencias de los excipientes, ni de los productos de degradación en la determinación del principio activo (8, 10-12)

Linealidad

Los valores obtenidos de los coeficientes de regresión y de determinación resultaron cercanos a la unidad, mayores a los regulados: 0,999 y 0,980, respectivamente, demostrando la existencia de correlación con una probabilidad elevada, así como el grado de relación entre las variables concentración y respuesta detectada por el equipo empleado. La desviación estándar relativa de la pendiente ($S_b \text{ rel}$) y el coeficiente de variación del factor de respuesta (CV_f) fue inferior al criterio establecido como máximo para estos indicadores: 2,0 y 5,0 %, respectivamente, ambos son considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. El valor obtenido del CV_f , demostró que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. Los resultados obtenidos demuestran la linealidad del método propuesto (8, 10-12)

Exactitud

Los **porcentajes** de recobro (R_m) obtenidos en el estudio, estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98,0 – 102,0 %), así como los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados ($\leq 2,0$ %).

En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar la prueba de Cochran se obtuvo que la G calculada fue menor que la G tabulada para un 95 % de confianza, por lo tanto, las varianzas de las concentraciones estudiadas fueron equivalentes, indicando que la concentración no influyó en la variabilidad de estos resultados.

Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100,0 % de recuperación, se obtuvo que el valor de t experimental fue menor que el valor de t tabulado, lo cual permite plantear que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el recobrado medio y el 100,0%, confirmando que el método es exacto, con una certeza del 95 % (8, 10-12)

Precisión

En el estudio de la repetibilidad se alcanzó un coeficiente de variación adecuado lo que demuestra la buena precisión del método según el límite para los métodos cromatográficos $CV \leq 2,0\%$.

Los valores que se obtienen de las pruebas de Fischer y t - Student, para el estudio de la precisión intermedia demuestran que no existen diferencias significativas entre las determinaciones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05%, ya que el valor de F calculada es menor que la F tabulada. Al realizar la prueba de t- Student el valor calculado resulta ser menor que el tabulado para una probabilidad de 0,05, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas, con un nivel de significación de un 5,0 % (8, 10-12)

Estudio de estabilidad

Los resultados obtenidos demostraron la estabilidad del producto, ya que después de transcurridos 6 meses se mantuvieron dentro de los límites previamente establecidos. La disminución del contenido de vitamina C en el tiempo fue inferior al 5,0 %, demostrándose la estabilidad del extracto acuoso de Acerola. Además, no se observaron cambios significativos, en los aspectos organolépticos, pH, ni en el conteo microbiano en ninguno de los frascos donde se encontraba la muestra en estudio. Por tanto el estudio de estabilidad vida de estante demostró que el extracto acuoso de Acerola no sufre cambios significativos, durante los 6 meses de duración del estudio, almacenadas las muestras a temperatura ambiente, al evaluar los parámetros establecidos en las especificaciones de calidad. (9)

No se observaron diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada envase empleado, cumpliéndose con el criterio de aceptación establecido. Por tanto, se pueden emplear indistintamente ambos envases, ya que no existen diferencias entre ellos.

El método cromatográfico validado, resultó lineal, preciso, exacto y específico, siendo posible su empleo en el control de la calidad y estudio de estabilidad del extracto acuoso de Acerola.

Los resultados del estudio de estabilidad, realizado a temperatura ambiente (30 ± 2 °C) y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR), demostraron que el extracto acuoso de Acerola es estable física, química y

microbiológicamente y que no existen diferencias significativas entre los envases empleados en el estudio.

Literatura Citada

1. Mezadri T, Fernández MS, Villaño D, García MC, Troncoso AM. El fruto de la acerola: composición, características productivas e importancia económica. Archivo Latinoamericanos de Nutrición; 2006; 56. p. 101-109. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php>.
2. Calvo I. La acerola (*Malpighia emarginata*) en Costa Rica. Ins Nac Innov Tran Tec Agr INTA.. Ministerio de Agricultura y Ganadería; 2007. p.1-28.
3. Oliva H, Rodríguez ME, Gutiérrez C, Frómata E. Estudio mercadotécnico en relación con la vitamina C obtenida de fuentes naturales. Ins de Inv de Cítr y Frut MINAGRI. 2000.
4. Segura M. Uso medicinal de la acerola (*Malpighia Emarginata L.*). Diplomado de Medicina Tradicional Mexicana. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 2010.
5. Torregosa F. Determinación de vitamina C y carotenoides en zumos de frutas y hortalizas frescos, tratados por calor o por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI). Tesis presentada en opción al grado académico de Doctor en Ciencias. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. 2006.
6. Gutiérrez TM, Hoyos OL, Páez MI. Determinación del contenido de ácido ascórbico en UCHUVA (*Physalis peruviana L.*), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Valle; 2007; 5. p. 71-79.
7. Manela M. Vitamina C. En Manela M, Mandarim CA, de Andrade M, Lima A, Cuzzi T. Vol. 78. An bras Dermatol, Rio de Janeiro; 2003. p. 265-274.
8. Anexo I: Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED). La Habana, Cuba; 2013. p. 3-25.
9. Regulación 23 -2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos. Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED). La Habana, Cuba; 2000. p. 4-10.
10. Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Center for Biologics Evaluation and Research. Pharmaceutical Quality/CMC; 2015. p. 3-16.
11. Bliesner DN. Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc. Publication ed. New Jersey, Estados Unidos; 2006.

12. Chung C. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. En: Chung C, Herman L, Lee YC, Zhang XM. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc. Publication ed. New Jersey, Estados Unidos; 2004. p. 11-50.
13. Rodríguez Y, Suárez Y, Izquierdo A. Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para ácido ascórbico en tabletas de producción nacional. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Rev Cubana Farm. 2009; 43(3). Disponible en: www.scielo.sld.cu.