



Validación del método DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, en la determinación de la capacidad antioxidante total en granos de cacao y chocolate artesanal de Bolivia

Jenry H. Sirpa-Poma*, G. L. Cruz-Ochoa, Heide Geovana Quispe Quelca, Juan Antonio Alvarado Kirígin

Instituto de Investigaciones Químicas IIQ-Alimentos, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz

Keys: Validation, DPPH, radical, TAC, cocoa; **Claves:** Validación, DPPH, radical, TAC, cacao.

ABSTRACT

Validation of the DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method for the determination of the total antioxidant capacity in cocoa beans and artisanal chocolate from Bolivia. This study focuses on validating the **DPPH method** (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) for assessing total antioxidant capacity in Bolivian cocoa beans and artisanal chocolate. Among available techniques, the DPPH assay is widely applied, and its validation ensures reliability of the results. The research aimed to confirm its suitability for determining antioxidant potential in these matrices. Trolox was employed as a reference standard to evaluate free radical inhibition. Eight performance parameters were analyzed according to ISO guidelines: precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, detection limit, quantification limit, working range, linearity, robustness, and measurement uncertainty. To quantify antioxidant capacity, cocoa bean samples were extracted with bidistilled ethanol, and the supernatant was tested for its inhibitory effect on the DPPH radical. Results were expressed as milligrams of Trolox equivalents per gram of sample, providing a standardized measure of antioxidant activity in both cocoa and artisanal chocolate.

RESUMEN

Este estudio se centra en la validación del método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) para evaluar la capacidad antioxidante total en granos de cacao bolivianos y chocolate artesanal. Entre las técnicas disponibles, el ensayo DPPH es ampliamente utilizado y su validación garantiza la fiabilidad de los resultados. La investigación tuvo como objetivo confirmar su idoneidad para determinar el potencial antioxidante en estas matrices. Se empleó Trolox como estándar de referencia para evaluar la inhibición de radicales libres. Se analizaron ocho parámetros de rendimiento según las directrices ISO: precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, rango de trabajo, linealidad, robustez e incertidumbre de medición. Para cuantificar la capacidad antioxidante, se extrajeron muestras de granos de cacao con etanol bidestilado y se analizó el sobrenadante para determinar su efecto inhibitorio sobre el radical DPPH. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra, lo que proporciona una medida estandarizada de la actividad antioxidante tanto en el cacao como en el chocolate artesanal.

Revista Boliviana de Química, 2026, 43, 115-127
ISSN 0250-5460, Rev. Bol. Quim. Paper edition
ISSN 2078-3949, Rev. boliv. quim. e-edition, Jan-Jun
30 junio 2026, <https://doi.org/10.53287/pyii9560fa91w>
© 2026 Universidad Mayor de San Andrés,
Facultad de Ciencias Puras y Naturales,
Carrera Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químicas
<https://bolivianchemistryjournaliiq.umsa.bo>

¹Received December 24, 2025, accepted June 8, 2026, published June 30, 2026. *Mail to: jenrysirpa@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El método DPPH para evaluar la actividad antioxidante se utiliza con frecuencia. En este trabajo, se validó una variante de este método para garantizar la confiabilidad del procesamiento de los datos en la evaluación de la actividad antioxidante de granos de cacao y tabletas de chocolate artesanal.

La actividad antioxidante se refiere a la inhibición de especies reactivas del oxígeno (ROS) que son generadas por la acción fisiológica natural o envejecimiento, entre otros. La producción intracelular excesiva de ROS causa varias enfermedades como artritis, hipertensión arterial, trastornos neurodegenerativos o cáncer. Los antioxidantes juegan un papel importante en la salud humana, ya que tienen la capacidad de inhibir o retrasar las reacciones de oxidación y así previenen el estrés oxidativo^{1 2 3 4}.

Entre los métodos empleados para evaluar la actividad antioxidante, destacan aquellos basados en reactivos químicos capaces de inhibir radicales libres, como el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) o el 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), que generan radicales libres estables.^{1 3}.

Para evaluar la actividad antirradicalaria o antioxidante, se utilizó el ensayo de reducción de DPPH, capaz de medir la capacidad de un compuesto para inhibir radicales libres, con el uso de un espectrofotómetro^{3 4 5}.

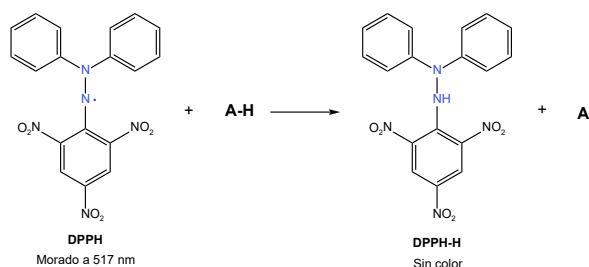


Figura 1. Reacción de reducción del radical libre DPPH⁵

Validación

Según la ISO 17025, validación es la confirmación, mediante examen y suministro de evidencia objetiva, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso previsto específico^{6 7 8 9 10}.

Según Camaró-Sala et al.¹⁰, un método debe ser validado cuando se incorpora por primera vez al laboratorio, o cuando se realiza un cambio en el método implementado. Además, debe validarse todo el procedimiento analítico y en todo el intervalo de aplicación, incluyendo toda la variedad de muestras.

Según diferentes publicaciones, el uso de la validación para ensayos experimentales en investigación científica se ha difundido bastante, y esto se basa en su importancia al aportar fiabilidad y reproducibilidad de resultados, incrementando la calidad de los mismos, en algunos casos específicos son requeridos para cumplir con ciertos requisitos normativos, además de que también pueden ayudar a desarrollar nuevos métodos experimentales. Autores como Cáceres et al.¹¹ realizaron una validación de una metodología basada en HPLC para determinar la concentración sérica de posaconazol, obteniendo como resultados, los parámetros cromatográficos más adecuados, cumpliendo con los criterios de aceptación recomendados por la Food and Drug Administration. La validación hizo que este trabajo, al cumplir con determinados criterios, sea útil para el seguimiento terapéutico de los pacientes bajo tratamiento con posaconazol.

Castillo Aguilar & González Hernández¹² utilizaron la validación para el desarrollo químico-farmacéutico de nuevos medicamentos, lo cual requirió de métodos analíticos que permitan cuantificar el producto asegurándose de cumplir con niveles de confiabilidad aceptables, los cuales pueden ser obtenidos tras un proceso de validación. Los resultados que se obtuvo en la práctica aseguraron una alta confiabilidad en 5 métodos analíticos propuestos para control de calidad, un estudio de estabilidad de materia prima y un ensayo de formulación.

En un estudio realizado por Chaile & Holgado⁶, se validó un método que permitió cuantificar, en forma confiable, la presencia de plaguicidas organoclorados (OC) en vinazas a fin de prevenir su reciclado medioambiental. Gracias a la validación, el método cromatográfico utilizado ofreció una buena alternativa para ser aplicado en muestras de vinazas con resultados confiables.

En el estudio realizado por Delgado et al.¹³, se validó una metodología analítica para estudiar la solubilidad de algunas sulfonamidas en mezclas cosolventes utilizando la espectrofotometría UV. Los resultados obtenidos mostraron que la metodología validada resultó ser adecuada para la cuantificación de las 3 sulfonamidas estudiadas, cumpliendo con los criterios de validación establecidos.

El autor Fernández-Varón et al.¹⁴, realizó el desarrollo y validación de una técnica de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de atorvastatina en plasma en un biomodelo experimental de arteriosclerosis en pollos, para ello, fue preciso disponer de una técnica que permita detectar el fármaco en cuestión en plasma, que presente a la vez resultados confiables. Según el estudio realizado, se mostró buenos resultados en cuanto a facilidad, coste y buena reproducibilidad de a la técnica validada.

Garza Juárez et al.¹⁵ desarrollo una metodología analítica que asegure la calidad y reproducibilidad de productos herbales a base de Damiana (*Turnera diffusa*). En este estudio se demostró su actividad antioxidante con el uso del método DPPH, y se desarrolló y validó un método analítico de HPLC-DAD para cuantificar un biomarcador que puede ser utilizado para su control de calidad. Además, se estableció una huella dactilar cromatográfica de la planta que sirve para el establecimiento de su identidad en productos comerciales que la contengan.

En el trabajo de Gavica Contreras⁹, se desarrolló un método alternativo para la identificación de ácidos fenólicos presentes en una infusión elaborada a partir de la cascarilla de la semilla de cacao (*Theobroma cacao L.*), el cual fue validado para garantizar la veracidad de los resultados obtenidos. El método desarrollado empleó un equipo de electroforesis capilar. La infusión se elaboró de acuerdo a procedimientos internacionales, además se evaluó el contenido de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu, flavonoides por el método de flavonoides totales y la actividad antioxidante por los métodos del porcentaje de inhibición de DPPH y el potencial antioxidante de reducción de hierro (FRAP).

En el trabajo de Granados Guzmán⁵, se desarrolló métodos in vitro a microescala, precisos y exactos capaces de determinar la potencial actividad antirradicalaria (por los métodos DPPH y ABTS) y antihiper glucemiante en extractos naturales, y la validación (con parámetros de desempeño de linealidad, precisión, exactitud, límites de cuantificación y detección, variabilidad de señal y robustez) les otorgó confiabilidad a los resultados obtenidos.

Rafael et al.¹⁶, comparó y validó tres métodos analíticos para el control de calidad de tabletas comerciales recubiertas que contienen 5-ASA: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•) y nitrosación. Para la validación de estos métodos se estudiaron los parámetros de linealidad, precisión y exactitud.

Exactitud

La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero¹². Normalmente se expresa en términos de precisión y veracidad^{6 7 9 17}.

Precisión

La precisión indica el grado de concordancia que los resultados tienen entre sí^{8 9 10 12 18}. La precisión se divide en dos parámetros repetibilidad y reproducibilidad^{6 7 9 10 13 16 17 19}.

Las medidas de precisión más comunes son en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia. La repetibilidad representa la variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, en el mismo equipo, en un período corto de tiempo^{8 9 10 12 18 20}; mientras que condiciones de precisión intermedia, se refiere a mediciones realizadas con diferentes analistas, en períodos de tiempo prolongados, en un mismo laboratorio^{6 7 9 19 18 20}.

Veracidad (sesgo)

La veracidad del método se refiere a la cercanía de la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real. Esto se realiza, generalmente comparando los resultados obtenidos por el método con el valor de un material de referencia, para comparar los valores será necesario conocer la precisión con la que este ha sido obtenido^{6 7 10 17 18 20}.

Linealidad y rango de trabajo

Linealidad se define como la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito^{6 8 9 12 17 18}. También es la relación lineal entre la señal y la concentración del analito⁷.

Rango de trabajo, es el rango de concentraciones donde existe una relación lineal entre estas y las señales analíticas. En este intervalo, los valores deben presentar un nivel aceptable de precisión y exactitud, por lo cual, no pueden ser inferiores al límite de cuantificación¹⁷.

Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LOD) se define como la mínima concentración del analito en una muestra que puede detectarse⁷¹⁸, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba^{6 8 10 17 18}.

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la cantidad de analito presente derivada de la menor señal analítica que puede ser medida con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y veracidad^{10 18}.

Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método (cambios en las condiciones ambientales u operativas) que se consideran las variables que gobiernan el experimento de medida^{8 9 12 18}. Para el estudio de robustez, estas condiciones se modifican ligeramente, siguiendo un determinado diseño experimental, y se comprueba su influencia en la señal analítica. Se dice que un método es robusto cuando se puede demostrar su invariabilidad durante el uso normal, proporcionando fiabilidad al método^{7 9 17}.

Incertidumbre

Según la definición planteada por el “Vocabulario Internacional de Metrología” (VIM): “la incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de valores que pueda ser razonablemente atribuido al mensurando”^{7 8}.

La incertidumbre proporciona entonces una idea de la calidad del resultado, ya que indica cuánto puede alejarse un resultado del valor considerado como “valor verdadero”^{7 19}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Precisión (Repetibilidad)

Los datos que pasaron la prueba de C de Cochran y k de Mandel, se sometieron a un estudio del error estándar de estimación (SEE) para determinar el modelo de mejor ajuste (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación del comportamiento de diferentes modelos para la repetibilidad

Tipo	SEE	Ecuación
Modelo constante (MC)	0,0039	$S_r = 0,010^*$
Modelo lineal (ML)	0,0020	$S_r = -0,005 + 0,034x$
Modelo lineal con intersección cero (ML0)	0,0019	$S_r = 0,023x$
Modelo potencial (MP)	0,0021	$S_r = 0,033x^{1,461}$
* S_r es la repetibilidad		

El mejor modelo resultante fue el modelo lineal con intersección en cero (ML0), con un SEE = 0,0019. Finalmente se cumplió con el criterio de validación (Tabla 2), donde: $S_r \leq \text{Criterio de validación}$, en todos los niveles de concentración estudiados.

Tabla 2. Criterio de validación para la repetibilidad

Muestra Patrón μM	$S_r = bX$	$\text{Criterio}_V = \frac{\sigma_r \cdot \sqrt{\chi^2_{((1-\alpha); v)}}}{\sqrt{v}}$	$S_r \leq \text{Criterio}_V$
20	0,014	0,084	Criterio de validación cumplido
50	0,012	0,081	Criterio de validación cumplido
100	0,010	0,077	Criterio de validación cumplido
150	0,008	0,077	Criterio de validación cumplido
200	0,006	0,069	Criterio de validación cumplido

χ^2 es el estadístico Chi-Cuadrado

σ_r es la estimación del valor de verificación de la dispersión del método en función del modelo de Horwitz, según ISO 13528

$v = n-1$, donde n es el número de mediciones individuales

Precisión (Precisión intermedia)

Los datos que superaron la prueba de G de Grubbs y h de Mandel, se sometieron al estudio del error estándar de estimación (SEE), donde se determinó el mejor modelo (Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación del comportamiento de diferentes modelos para la precisión intermedia

Tipo	SEE	Ecuación
Modelo constante (MC)	0,0043	$S_L = 0,022^*$
Modelo lineal (ML)	0,0005	$S_L = 0,008 + 0,032x$
Modelo lineal con intersección cero (ML0)	0,0028	$S_L = 0,051x$
Modelo potencial (MP)	0,0006	$S_L = 0,037x^{0,636}$

* S_L es la precisión intermedia

El mejor modelo resultante fue el Modelo lineal (ML), con un SEE = 0,0005.

Finalmente se cumplió con el criterio de validación establecido (Tabla 4), donde: $S_L \leq \text{Criterio de validación}$, en todos los niveles de concentración estudiados.

Tabla 4. Criterio de validación para la precisión intermedia

Muestra Patrón μM	$S_L = a + bX$	$\text{Criterio}_V = \frac{\sigma_L \cdot \sqrt{\chi^2_{((1-\frac{\alpha}{2}); v)}}}{\sqrt{T}}$	$S_L \leq \text{Criterio}_V$
20	0,027	0,150	Criterio de validación cumplido
50	0,025	0,144	Criterio de validación cumplido
100	0,022	0,136	Criterio de validación cumplido
150	0,019	0,128	Criterio de validación cumplido
200	0,017	0,135	Criterio de validación cumplido

χ es el estadístico Chi-Cuadrado

σ_L especificación definida según ASTM D1068

$v = n-1$, donde n es el número de mediciones individuales

Veracidad (Sesgo)

Todos los valores encontrados fueron sometidos a la prueba de G de Grubbs, de los cuales se eliminaron aquellos que no superaron la prueba. Los datos aceptados, fueron sometidos a una evaluación del sesgo y nivel de significancia (Figura 2).

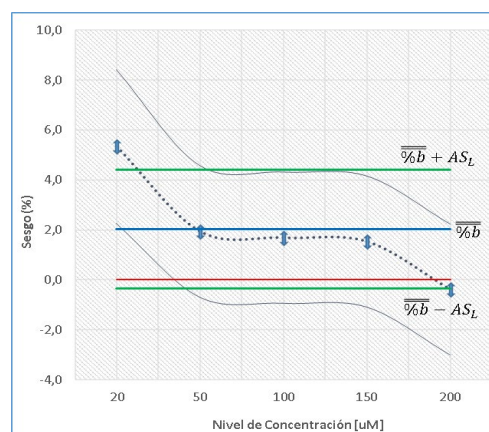


Figura 2. Evaluación del sesgo y nivel de significancia, $\overline{\%b}$ es el promedio global del sesgo, A es el coeficiente dado al 95% de probabilidad, S_L es la precisión intermedia.

En la Figura 2 se puede observar, que el valor de referencia “0” (línea roja), se encuentra dentro de los límites superior e inferior (líneas verdes) (al 95 % de confianza) definidos según el valor promedio global del sesgo (línea azul), por lo tanto, el sesgo asignado al método no es significativo.

También se aplicó un criterio de validación (Tabla 5) para este parámetro.

Tabla 5. Criterio de validación para la veracidad

$\overline{\%b} = \frac{\sum \%b}{N}$	$\left(\beta - \frac{t_{1-\frac{\alpha}{2}, N-1} \cdot S_{\%b}}{\sqrt{N}} \right)$	$\left(\beta + \frac{t_{1-\frac{\alpha}{2}, N-1} \cdot S_{\%b}}{\sqrt{N}} \right)$	$\left(\beta - \frac{t_{1-\frac{\alpha}{2}, N-1} \cdot S_{\%b}}{\sqrt{N}} \right) \leq \overline{\%b} \leq \left(\beta + \frac{t_{1-\frac{\alpha}{2}, N-1} \cdot S_{\%b}}{\sqrt{N}} \right)$
2,02	-10,55	10,55	Criterio de validación cumplida

$\overline{\%b}$ es el promedio del sesgo en términos relativos
 $S_{\%b}$ es la desviación estándar del sesgo en términos relativos
 N es el número de mediciones en un nivel de concentración
 t es la prueba t de Student
 β es el nivel de sesgo definido en función del método de referencia

Entonces, tras superar el criterio de validación, se encontró el valor del sesgo del método dentro del rango de concentraciones establecido, el cual fue de:

$$\overline{\%b} = 2,02 \pm 2,38$$

Límite de detección y límite de cuantificación

Se realizó la evaluación de las recuperaciones de los datos (Figura 3) utilizando la prueba G de Grubbs.



Figura 3. Evaluación de consistencia inter-ensayos

La Figura 3 nos muestra que los datos fueron consistentes dentro del rango de concentraciones establecido. La evaluación de la linealidad de la curva de calibración, logró superar la prueba del estadístico t de Student, confirmando que el rango de trabajo pertenece a un modelo lineal. Posteriormente se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación, a los que les corresponde los siguientes valores:

$$\text{Límite de Detección (LD)} = 4,255 [\mu M]$$

$$\text{Límite de Cuantificación (LC)} = 8,511 [\mu M]$$

Linealidad y rango de trabajo

Para el estudio del rango de trabajo, tras eliminar los datos no consistentes según la prueba G de Grubbs, se realizó la evaluación de la consistencia de los datos inter-ensayos (Figura 4).



Figura 4. Evaluación de consistencia inter-ensayos

Además, para la evaluación de las recuperaciones, el valor de referencia (100 %) debe encontrarse dentro de los límites inferior y superior de los intervalos de confianza (Figura 5).

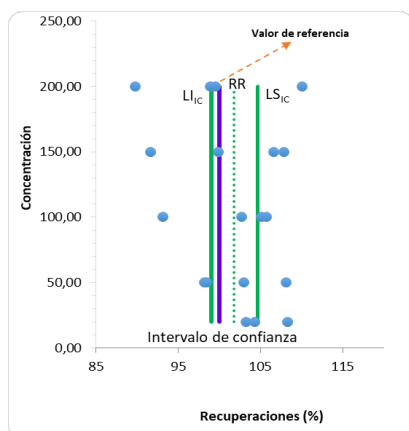


Figura 5. Evaluación de recuperaciones, LI_{IC} es el límite inferior del intervalo de confianza, LS_{IC} es el límite superior del intervalo de confianza, RR es la razón de recuperación.

Posteriormente para el análisis de la linealidad, se realizó un estudio de regresión lineal con polinomios de 1er, 2do y 3er grado, buscando que el sistema de medición tenga la misma exactitud con respecto a cada valor de referencia en el rango estudiado. A través del estadístico t de Student, se encontró variables significativas durante este estudio, por lo que se recurrió al uso de un criterio de validación (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis del cumplimiento del criterio de validación

Muestra Patrón μM	$\bar{X}$ μM	$*D = \frac{X_{MP} - X_{1er}}{X_{1er}} \times 100\%$	ET** %	Criterio V = $0,5 \times ET$	$ D \leq \text{Criterio V}$
20	20,76	-1,33	48,40	24,20	Criterio de verificación cumplido
50	52,68	2,97	20,79	10,39	Criterio de verificación cumplido
100	98,72	-0,44	12,61	6,31	Criterio de verificación cumplido
150	146,51	-1,76	10,41	5,21	Criterio de verificación cumplido
200	199,58	0,93	9,52	4,76	Criterio de verificación cumplido

**ET: es el error total o sesgo, fue calculado utilizando la ecuación que describe la incertidumbre de medición

*D: es diferencia debido al desvío de linealidad

X_{MP} : Es el valor estimado según el modelo del polinomio con mayor valor de t

X_{1er} : Es el valor estimado según el modelo de primer orden

Como se puede observar en la Tabla 6, se cumplió con el criterio de validación, donde el desvío de linealidad $|D| \leq$ Error permitido.

El rango lineal y el rango de trabajo poseen los mismos límites superiores, pero diferentes límites inferiores. El rango lineal comprende desde la concentración más baja del patrón hasta la más alta (20 a 200 μM), y el rango de trabajo está definido desde el límite de cuantificación hasta el límite superior del rango lineal, por lo tanto, se tiene que:

$$\text{Rango lineal} = (20,00 \text{ a } 200,00) [\mu M]$$

$$\text{Rango de trabajo} = (8,51 \text{ a } 200,00) [\mu M]$$

Robustez

Para este estudio se identificó 3 factores que se consideraron los más importantes para evaluar la robustez del ensayo (Tabla 7).

Tabla 7. Factores experimentales

Factor	Descripción	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
A	Baño de hielo para conservar la disolución de DPPH	Con hielo	Sin hielo
B	Tiempo de estabilidad de la mezcla DPPH-analito	15 min	30 min
C	Luz artificial en el laboratorio	Con luz	Sin luz

Para cada factor se determinó su nivel superior e inferior, elaborando un diseño experimental (Tabla 8).

Tabla 8. Diseño experimental

Nº	A	B	C
1	+	+	-
2	-	+	+
3	-	-	+
4	+	-	-

Los resultados obtenidos por duplicado fueron sometidos a una evaluación de los efectos (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de los factores

	A	B	C
Efectos $E_{promedio}$	-3,65	3,88	3,65
Efectos $E(X_1)$	6,19	-2,43	6,19
Efectos $E(X_2)$	1,10	10,18	1,10
Diferencia (d_E)	5,09	12,62	5,09
Variación entre las Diferencias (S)	5,49		

De la Tabla 9 se evaluó la significancia de cada efecto individual utilizando el estadístico t de Student (Tabla 10), donde el criterio de validación fue el siguiente: Si $t < t_{cri}$ los efectos no son significativos y el método es robusto ante los cambios realizados. Esto para un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 10. Evaluación de los efectos

Factor	Descripción	E	S	t_m	$t_m \leq t_{cri}$
A	Baño de hielo para conservar la disolución de DPPH	-3,6	5,5	-0,9	Efecto no significativo
B	Tiempo de estabilidad de la mezcla DPPH-analito	3,9	5,5	1,0	Efecto no significativo
C	Luz artificial en el laboratorio	3,6	5,5	0,9	Efecto no significativo

De la Tabla 10 se obtuvo la Figura 6 donde se visualiza el comportamiento de la significancia de los efectos de los factores estudiados.

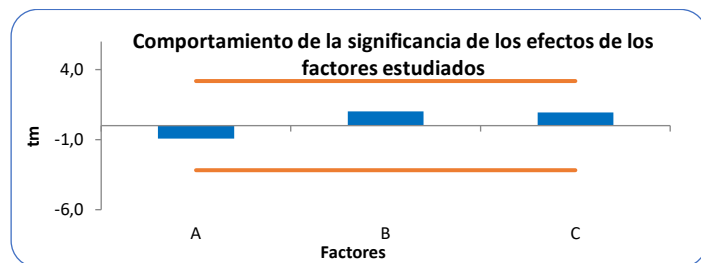


Figura 6. Comportamiento de la significancia de los efectos de los factores estudiados

Como se puede observar en la Figura 6, los efectos individuales se encontraron dentro de los límites definidos.

Incertidumbre

Se identificaron las siguientes fuentes de incertidumbre:

- ◆ Error aleatorio: repetibilidad (S_r)
- ◆ Sesgo del laboratorio: precisión intermedia (S_L)
- ◆ Veracidad: sesgo

- ◆ Otras fuentes del laboratorio: desviación respecto al valor nominal

Se calculó individualmente la incertidumbre típica que aporta cada fuente de incertidumbre (Tabla 11).

Tabla 11. Fuentes y contribución a la incertidumbre típica

Magnitud	Contribución a la incertidumbre típica ($\mu_{i(y)}$)
Repetibilidad (S_r)	0,450
Reproducibilidad interna (S_L)	0,655
Sesgo (δ)	3,825
Variación del valor nominal ($C_i \cdot \mu_{(xi)}$) *	2,858

* C_i : Pendiente de los estudios de linealidad

$\mu_{(xi)}$: Varianza entre los grupos del estudio de sesgo usando ANOVA

Se determinó la incertidumbre combinada según la ecuación:

$$\mu_c(R) = \sqrt{\mu^2(\delta) + S_L^2 + \sum_{i=1,n} C_i^2 \mu^2(X_i) + S_r^2}$$

En la Tabla 12 se observa el resultado de la incertidumbre combinada, y en la Tabla 13 los grados efectivos de libertad y el factor de cobertura.

Tabla 12. Incertidumbre combinada correspondiente al patrón de Trolox, 20 μ M

Incertidumbre combinada	Unidad
4,84	μ M

Tabla 13. Grados efectivos de libertad (U_{ef}) y factor de cobertura (k)

U_{ef}	18,02
k	2,10

La incertidumbre que acompaña al valor de la medida es la incertidumbre expandida, la cual no es más que el producto entre la incertidumbre combinada y el factor de cobertura k . Por lo tanto, el reporte del resultado para el valor de referencia utilizado (20 μ M) fue el siguiente:

$$R = (20,00 \pm 9,68) [\mu M]$$

La ventaja del uso de la norma ISO 21748, es que se puede obtener un modelo matemático para la estimación de la incertidumbre expandida (U_R) para cualquier valor de medida dentro del rango de trabajo. El modelo que se encontró fue el siguiente:

$$U_R = 2 * \sqrt{22,73902 + 0,000598885X + 0,001696467X^2}$$

En la Tabla 14 se puede visualizar el comportamiento de la incertidumbre expandida, para los patrones utilizados, que son dependientes del valor de la medición:

Tabla 14. Comportamiento de la incertidumbre dentro del rango de trabajo

Muestra Patrón	U	U_R
μ M	μ M	%
20,00	9,68	48,40
50,00	10,39	20,79
100,00	12,61	12,61
150,00	15,62	10,41
200,00	19,05	9,52

U: Incertidumbre expandida

U_R : Incertidumbre expandida relativa

En la Figura 7 se muestra la contribución de cada fuente de incertidumbre respecto de la incertidumbre total.

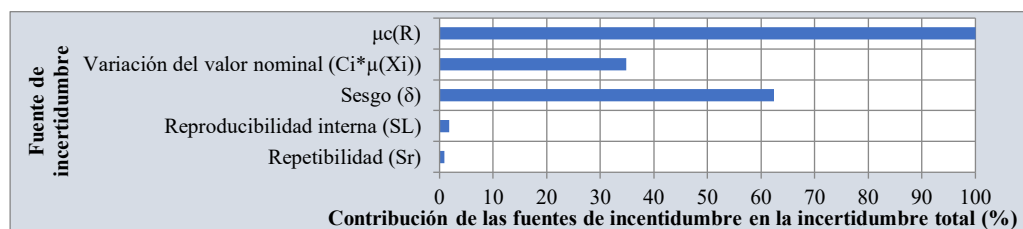


Figura 7. Contribución de las fuentes de incertidumbre. $\mu_c(R)$ es la incertidumbre combinada (Suma de todas las fuentes de incertidumbre)

Capacidad antioxidante total de las muestras de cacao

Aplicando el método validado de antioxidantes DPPH a 4 muestras de granos de cacao y 6 tabletas de chocolate, y procesándolas según se indicó en la parte experimental, se pudo obtener los valores de antioxidantes totales (Tabla 15) expresados como μ moles equivalentes de Trolox por g de muestra fresca con sus respectivas incertidumbres expandidas.

Tabla 15. Capacidad antioxidante total en muestras de granos de cacao y tabletas de chocolate artesanales

Granos de cacao [μ M]				Tabletas de chocolate [μ M]			
Lugar	Código	Media	Incertidumbre	Lugar	Código	Media	Incertidumbre
San Felipe	C-10	247,8	22,5	Sapecho	MT-10	28,3	9,8
Chocolatal	C-17	78,3	11,5	Baures	MT-11	19,0	9,7
Consata	M-8	75,4	11,4	Urubicha de Guarayos	MT-2	32,1	9,9
Guayaramerín	MC-4	750,9	62,6	San Carlos de Yapacaní	MT-5	30,0	9,9
				San Ignacio de Moxos	MT-9	315,1	27,7
				Sapecho	MT-12	61,7	10,8

EXPERIMENTAL

Muestreo

Las muestras fueron colectadas en diferentes zonas productoras de cacao en Bolivia. Las muestras colectadas comprenden, granos secos de cacao, mazorcas de cacao y tabletas de chocolate artesanales. De entre estas se eligieron 10 muestras al aleatoriamente.

Reactivos y equipos

2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Marca ALDRICH, D9132-1G), ácido ($\pm$)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Marca ALDRICH, 238813-5G, 97%), etanol bidestilado. Espectrofotómetro UV-Vis, lector multiplacas, CYTATION 3 imagen reader, BioTek.

Extracción del analito

Para el caso de las muestras de mazorcas de cacao, se las procesó siguiendo el procedimiento general para la obtención de granos de cacao seco.

Se pesó 0,05 g de muestra (variable dependiente del contenido de antioxidantes), se agregó etanol bidestilado (variable dependiente del rango de la curva estándar patrón) a la muestra, la mezcla resultante se sometió a baño ultrasónico a 0 °C durante 20 minutos para posteriormente centrifugar el sobrenadante a 12400 rpm por 4 minutos a 4 °C. El sobrenadante se colectó para análisis.

Método DPPH empleado

El radical DPPH• se preparó en etanol bidestilado¹⁶, a una concentración aproximadamente de 0,176 mM, o hasta que la absorbancia de la solución sea igual a $0,70 \pm 0,02$, para la reacción se preparó en un tubo de ensayo, tomando 1 mL de la solución de DPPH y se añadió 100 μ L del analito, la mezcla se agitó durante 10 s, y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos, para posteriormente leer la absorbancia a 519 nm, siendo este el pico de máxima absorción tras realizar un barrido de longitudes de onda con el espectrofotómetro^{1,5,15}. Se elaboró una curva estándar utilizando Trolox como patrón para la inhibición del DPPH² para ello se preparó soluciones de Trolox entre 20 a 200 μ M, se graficó el % de Inhibición Vs la concentración de Trolox. Para calcular el % de Inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{\text{blanco}} - Abs_{\text{analito}}}{Abs_{\text{blanco}}} \times 100$$

La capacidad antioxidante total (TAC) se calculó con la siguiente ecuación, expresándolo como μmoles equivalentes de Trolox por g de muestra fresca:

$$TAC \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g fw}} \right) = \frac{\% \text{ Inhibición}}{\text{pendiente}} \times 0,001 \times FD$$

Donde:

fw: sobre base fresca

pendiente: de la curva estándar (expresada como “% Inhibición/[Trolox]”)

FD: factor de dilución por solvente de extracción (etanol), [mL/g muestra]

0,001: constante del factor de conversión de L a mL

Validación

Para el proceso de validación se evaluó 8 parámetros de desempeño: Precisión, veracidad, linealidad^{11,16}, límite de detección, límite de cuantificación^{19,20}, rango de trabajo y robustez.

Precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia, según la ISO 5725-2. Para la repetibilidad se trabajó durante 5 días diferentes, con 5 niveles de concentración de Trolox y triplicado en cada día de análisis. Para analizar los datos obtenidos, estos pasaron por una evaluación de datos atípicos de dispersión (Test C de Cochran) y consistencia intra-ensayos (Test k de Mandel). La repetibilidad se expresó como la desviación estándar relativa (S_r), cuyo valor no debe sobrepasar al criterio de aceptación definido según la norma CLSI EP15-A. Para la precisión intermedia se trabajó durante 12 días diferentes, con 5 niveles de concentración del patrón Trolox. Los datos obtenidos pasaron la prueba de valores atípicos de centralidad (G de Grubbs) y la consistencia de datos inter-ensayos (Test h de Mandel). La precisión intermedia se expresa como la desviación estándar relativa (S_L), cuyo valor no debe sobrepasar al criterio de validación definido según la norma CLSI EP15-A.

Veracidad (Sesgo)

Este estudio se basó en la norma ISO 5725-4, el cual requirió haber aprobado previamente los parámetros de desempeño de repetibilidad y precisión intermedia, ya que esta norma así lo requiere. Para este estudio se evaluó 5 niveles de concentración del patrón (Trolox) frente a los valores reales preparados, realizados en diferentes días, cuyos datos, tras haber pasado el filtro de valores atípicos de centralidad (G de Grubbs), fueron sometidos a una evaluación del sesgo y nivel de significancia, y finalmente el criterio de validación según la norma CLSI EP15-A.

Linealidad y rango de trabajo

La linealidad se evaluó en un rango de concentraciones entre 20 a 200 μM del patrón (Trolox), con 5 puntos diferentes de concentración. Para el rango de trabajo se siguió las directrices según las normas ISO 13530 y 11842, para el estudio de recuperaciones dentro de este parámetro de desempeño, se hizo uso de la norma ISO 16269-6, además se realizó la evaluación de discriminación de datos según el test G de Grubbs, para posteriormente realizar una evaluación de la consistencia de las recuperaciones, donde además se determinó si el valor de referencia (100 %) se encontró dentro de los intervalos superior e inferior del intervalo de confianza. Para la evaluación de linealidad en el rango de trabajo previamente determinado, se utilizó la norma ISO 28037, donde se hizo un análisis de regresión lineal para un polinomio de 1er, 2do y 3er grado, para encontrar en estas variables significativas utilizando el estadístico t de Student, en caso de encontrar variables significativas, se aplica un criterio de validación para aceptar o rechazar la linealidad dentro del rango de trabajo ya definido, este criterio de validación se basa en la norma ISO 28037.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Para la identificación del límite de detección y cuantificación, se siguió las directrices según la norma ISO 11842-2, comenzando con una evaluación de recuperaciones de los 5 niveles de concentración del patrón (Trolox), los cuales superaron la prueba de consistencia inter-ensayos a través del estadístico G de Grubbs. Posteriormente se utilizó el estadístico t de Student para comprobar la correlación entre los valores teóricos y experimentales encontrados para cada nivel de concentración, indicándonos si el modelo de la curva es lineal, tras superar esta prueba de linealidad se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación.



Robustez

El propósito de este estudio, fue encontrar las variables (o factores experimentales) que puedan influir importantemente en los resultados de las mediciones, y para determinar hasta qué punto pueden ser controladas estas variables, para ello se realizó el diseño experimental, arreglo experimental y criterio de validación, según las directrices propuestas por la ASTM E 1169, el cual ayudó a identificar factores que afectaban al método de análisis. Para este estudio se consideró los 3 factores que más podrían influir en el método, los cuales fueron: baño de hielo para la solución de DPPH, tiempo de estabilidad de la mezcla reacción DPPH-analito y uso de luz artificial en el laboratorio durante el procedimiento.

Incertidumbre

La incertidumbre de medición se la realizó según indica la norma ISO 21748, para determinar la incertidumbre asociada a los resultados obtenidos. Se identificó las fuentes de las incertidumbres individuales, tanto sistemáticas como aleatorias del método, para luego ser evaluadas y relacionadas con los resultados obtenidos en el estudio de los parámetros de desempeño de: precisión, veracidad y linealidad, para así determinar finalmente la incertidumbre de medición.

CONCLUSIONES

De los resultados encontrados respecto al estudio de precisión, se puede decir que el método laboratorial cumple con las condiciones adecuadas y necesarias para el uso previsto tras cumplir con los criterios de validación, esto en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

Del estudio de la veracidad, se puede decir que el sesgo asignado al método no fue estadísticamente significativo dentro del rango del rango de concentraciones definido, ya que el valor de referencia se encontró dentro de los límites permisibles cumpliendo con el criterio de validación.

Al cumplirse con los criterios de validación para el estudio de linealidad, y además al obtenerse resultados de recuperaciones adecuados para el estudio del rango de trabajo, entonces se puede aceptar la definición del rango de trabajo como un intervalo que va de (8,51 a 200,00) [uM]

Para el estudio de la robustez del método, el impacto de los errores de los componentes sistemáticos y aleatorios, asociados al método de ensayo, no afectaron la robustez y solidez del método dentro de rango de trabajo, por lo tanto, el método para determinar la capacidad antioxidante total por el método DPPH es robusto y sólido para el rango de trabajo definido bajo las condiciones en las que se trabajó en el laboratorio.

El comportamiento de la incertidumbre expandida, nos muestra que éste varía de manera inversamente proporcional respecto al valor de medición, es decir que, a bajas concentraciones del analito, la incertidumbre se incrementa, y a medida que se trabaja con concentraciones más altas, la incertidumbre disminuye. Esto es debido a los efectos que provocan las diferentes fuentes de incertidumbre, entre las cuales tenemos al sesgo, con un 62,45 % y la variación del valor nominal (como producto entre la varianza entre los grupos del estudio de sesgo usando ANOVA y la pendiente de la regresión lineal de primer grado proveniente del estudio de linealidad) con un 34 %, como las fuentes que aportan con mayor incertidumbre a la incertidumbre total de medición.

Tras cumplir con los criterios de validación para los 8 parámetros de desempeño estudiados se puede concluir que el método de antioxidantes totales DPPH fue validado para su uso previsto en el laboratorio donde se realizó el presente trabajo. Además, se deja evidencia de la aplicación del método validado al aplicarlo a muestras de granos de cacao y tabletas de chocolate, al determinar la capacidad antioxidante total de las mismas, representándolas como μM de equivalentes de Trolox por gramo de muestra, expresadas con sus respectivas incertidumbres de medición.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a SIDA – Sweden, que a través del DIPGIS – UMSA, financiaron el proyecto dentro del cual fue realizado el presente trabajo.

REFERENCIAS

¹ J. Rumpf, R. Burger, and M. Schulze, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, **233**, 123470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>

² S.-J. Hwang, and J.-H. Lee, *Food Sci. Technol*, 2023, **43**, 1. <https://doi.org/10.1590/fst.121522>



-
- ³ P. N. Salazar Quiroz, **2019**. Validación de la técnica de DPPH-CLAR como método para la actividad antioxidante de metabolitos secundarios hidrofílicos extraídos de actinobacterias (BSc tesis), Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México, recuperado de <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/26065>
- ⁴ A. C. Zarate Jiménez, **2019**, Validación de la técnica de DPPH-CLAR como método para la actividad antioxidante de metabolitos secundarios lipídicos extraídos de actinobacterias (BSc tesis), Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México, recuperado de <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/26199>
- ⁵ G. Granados Guzmán, **2016**, Optimización y validación de ensayos in vitro a micro escala. Indicadores de actividad antirradicalaria y antihiper glucémica en extractos de plantas (PhD tesis), Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad de México, México, recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/18478/>
- ⁶ A. P. Chaile, and M. M. E. Ferreyra de Ruiz Holgado, *Rev. Bol. Quím.*, 2019, **36**, 210. DOI: 10.34098/2078-3949.36.5.3
- ⁷ R. O. Crubellati and C. D. Di Risio, 'Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas', CYTED, Buenos Aires, 2009.
- ⁸ C. A. León Gil, **2009**, Estandarización y validación de una técnica para medición de la demanda Bioquímica de oxígeno por el método respirométrico y la demanda química de oxígeno por el método calorimétrico (BSc tesis), Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia, recuperado de <https://hdl.handle.net/11059/1780>
- ⁹ W. Gavica Contreras, **2016**, Validación de la determinación de los ácidos fenólicos presente en la infusión de cascarilla de la semilla de cacao (*theobroma cacao*) por el equipo de electroforesis capilar (BSc tesis), Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador, recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/19998/1/BCIEQ-T-0196%20Gavica%20Contreras%20Wendy%20Otilia.pdf>
- ¹⁰ M. L. Camaró-Sala, R. Martínez-García, P. Olmos-Martínez, V. Catalá-Cuenca, M. D. Ocete-Mochón, and C. Gimeno-Cardona, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2015, **33**, e31. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- ¹¹ D. H. Cáceres, J. D. Zapata, S. D. Granada, L. E. Cano, and T. W. Naranjo, *Revista Iberoamericana de Micología*, 2016, **33**, 230. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.09.002>
- ¹² B. Castillo Aguilar, and R. González Hernández, *Revista Cubana de Farmacia*, 1996, **30**.
- ¹³ D. R. Delgado, G. A. Rodríguez, J. A. Martínez, J. H. Rojas, and F. Martínez, *Rev. Colomb. Quim.*, 2013, **42**, 31.
- ¹⁴ E. Fernández-Varón, R. Bermejo, I. Ayala, B. García-Pérez, A. Tvarijonavičiūtė, and C. Cárcelos, *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 2005, **17**, 223. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(05\)73346-5](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(05)73346-5)
- ¹⁵ A. Garza Juárez, J. Pérez Meseguer, R. Salazar Aranda, M. de la L. Salazar Cavazos, and N. Waksman de Torres, *Ciencia UANL*, 2010, **XVIII**, 397.
- ¹⁶ J. A. Rafael, J. R. Jabor, R. Casagrande, S. R. Georgetti, M. de F. Borin, and M. J. V. Fonseca, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2007, **43**, 97. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000100012>
- ¹⁷ J. M. Jurado, R. Muñiz-Valencia, A. Alcázar, S. G. Ceballos-Magaña, and J. González, *Educ. quim.*, 2016, **27**, 21. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.09.009>
- ¹⁸ J. C. Velandia Castellanos, **2008**. Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria (BSc tesis), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, recuperado de <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8377>
- ¹⁹ C. Ramírez, E. Olarte, E. Tellez, and M. Palma, *Rev. Colomb. Quim.*, 2013, **42**, 326.
- ²⁰ O. E. L. Lozano, M. G. Torres, C. H. Castro, and A. López, *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 2005, **36**, 149.