Estandarización y validación de una metodología analítica para la determinación de ácido 1-naftalenacético (ANA) en aceites refinados obtenidos a partir de aceite de palma crudo del cultivar interespecífico OxG

Jhon Alexander Martínez Riveros

Trabajo de grado para optar por el título de químico

Directora
Stelia Carolina Méndez Sánchez
PhD. en Química

Codirector
Jose Leonardo Guerrero Niño
MSc. en Química

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Química
Bucaramanga

2026

Tabla de contenido

Introducción 9

1. Planteamiento del problema 14

2. Justificación 15

3. Objetivo 16

1.1 Objetivo general 16

1.2 Objetivos específicos 16

4. Marco teórico 17

1.3 Antecedentes 17

1.4 Auxinas 20

1.5 Ácido 1-Naftalenacético 21

1.6 Aplicación del ANA en la agroindustria 22

1.7 Regulaciones internacionales del ANA sobre productos agrícolas 24

1.8 Metabolismo de ANA 25

1.9 Métodos analíticos para la determinación de ANA 28

1.10 Métodos cromatográficos 29

1.10.1 Métodos electroquímicos 29

1.10.2 Métodos fluorimétricos 30

1.11 Validación de metodologías analíticas. 32

1.12 Parámetros de validación 32

1.12.1 Selectividad 32

1.12.2 Rango de linealidad 33

1.12.3 Límite de detección (LOD) 34

1.12.4 Límite de cuantificación (LOQ) 36

1.12.5 Exactitud 37

1.12.6 Precisión 38

1.12.7 Veracidad-recuperación 38

1.12.8 Robustez *39*
1.12.9 Incertidumbre *39*
5. Metodología 42
1.13 Materiales 42
1.13.1 Reactivos *42*
1.13.2 Equipos *43*
1.13.3 Materiales *43*
1.14 Desarrollo y optimización del método 43
1.14.1 Fases móviles *44*
1.14.2 Stock de ANA *44*
1.15 Condiciones cromatográficas 44
1.16 Preparación de la muestra 45
6. Resultados y discusión 46
1.17 Evaluación de los disolventes de extracción 46
1.18 Efecto matriz 49
1.19 Rango lineal y de trabajo 52
1.20 Precisión, exactitud y recuperación 56
1.20.1 Precisión *56*
1.20.2 Exactitud *58*
1.20.3 Porcentaje de recuperación *59*
1.21 Incertidumbre 60
7. Aplicación del método 61
8. Conclusiones 63
Referencias bibliográficas 65
Apendices 71

Lista de tablas

Tabla 1. Valores máximos permitidos para el ácido 1-naftalenacético en algunas frutas y productos de consumo humano de acuerdo con la EPA y la U.E 25

Tabla 2. Métodos desarrollados para la detección y cuantificación de ANA, en diversas matrices 31

Tabla 3. Gradiente de elución usado para la separación cromatográfica de ANA. 45

Tabla 4. Datos obtenidos para las curvas de calibrado preparadas en días distintos. 52

Tabla 5. Datos obtenidos en el análisis intradía. 56

Tabla 6. Datos obtenidos en el análisis interdía. 56

Tabla 7. Datos obtenidos para los análisis diarios. 61

Tabla 8. Incertidumbres estimadas durante la validación. 61

Tabla 9. Muestras aceite refinado analizadas. 62

Lista de figuras

Figura 1. Fórmula estructural del ácido indol-3-acético (izquierda) y del ácido 1-naftalenacético (derecha). 23

Figura 2. Ruta metabólica de biotransformación de ANA en humanos y ratones Fase I. 26

Figura 3. Conjugación metabólica del ANA en humanos y ratones Fase II. 27

Figura 4. Procedimiento para extracción de ANA en aceite refinado. 46

Figura 5. Recuperación de ANA en los diferentes disolventes de extracción. 47

Figura 6. Gráfica de la supresión de la señal analítica, debido al efecto de la matriz de estudio. 50

Figura 7. Curva de calibración en cinco días distintos. 53

Figura 8. Curva de trabajo. 54

Figura 9. Gráfico de los residuales para la curva de trabajo 55

Figura 10. Recuperación de ANA en días distintos. 59

Lista de apéndices

Apéndice A. Porcentaje de recuperación de ANA con distintos solventes de extracción. .. 71

Apéndice B. evaluación del efecto matriz. 72

Apéndice C. Precisión y exactitud día 1. 73

Apendice D. Precisión y exactitud día 2. 74

Apendice E. Precisión y exactitud día 3. 75

Apendice F. Datos obtenidos para 50 muestras reales. 76

Resumen

Título: Estandarización y validación de una metodología analítica para la determinación de ácido 1-naftalenacético (ANA) en aceites refinados obtenidos a partir de aceite de palma crudo del cultivar interespecífico OxG*

Autor: Jhon Alexander Martínez Riveros**

Palabras clave: Ácido 1-naftalenacético, aceite de palma, cromatografía líquida de alta eficiencia, detección por fluorescencia, validación analítica.

Descripción:

El ácido 1-naftalenacético (ANA) es una auxina sintética utilizada en la polinización artificial de cultivares interespecíficos OxG de palma de aceite para favorecer la formación y el desarrollo de frutos. Sin embargo, la información disponible sobre su posible residualidad en aceites refinados de palma es limitada, lo que evidencia la necesidad de desarrollar metodologías analíticas confiables para su monitoreo. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y validar un método para la cuantificación de ANA en aceites refinados de palma, basado en una extracción líquido-líquido con acetonitrilo acidificado con ácido acético al 0,2 % (v/v), seguida de análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por fluorescencia (HPLC-FLD).

La evaluación del efecto matriz evidenció una supresión de la respuesta analítica del 33,7 % con respecto a la calibración en solvente, por lo que se empleó calibración en matriz para garantizar una cuantificación adecuada. El método presentó comportamiento lineal en el intervalo de 5 a 200 µg/L, con límites de detección y cuantificación de 2 y 5 µg/L, respectivamente. Asimismo, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 100,0 y 101,0 % en los niveles de concentración evaluados, acompañados de valores de precisión que cumplieron los criterios de aceptación establecidos.

La metodología validada fue aplicada al análisis de 50 muestras de aceite refinado provenientes de cultivares OxG, encontrándose concentraciones de ANA inferiores al límite de cuantificación en la totalidad de las muestras analizadas. Estos resultados evidencian la ausencia de residuos cuantificables de ANA en los aceites evaluados bajo las condiciones actuales de polinización artificial y demuestran la idoneidad del método desarrollado para la determinación de este regulador de crecimiento en matrices oleosas.

---

*Trabajo de grado modalidad práctica empresarial.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Química. Directora: Stellia Carolina Méndez, Ph.D. Codirector: Jose Leonardo Guerrero Niño, Químico, MSc.

Abstract

Title: Standardization and validation of an analytical methodology for the determination of 1-naphthaleneacetic acid (NAA) in refined oils obtained from crude palm oil of the interspecific OxG cultivar*

Author: Jhon Alexander Martínez Riveros**

Keywords: 1-naphthaleneacetic acid, palm oil, high-performance liquid chromatography, fluorescence detection, analytical validation.

Description:

1-Naphthaleneacetic acid (NAA) is a synthetic auxin used in the artificial pollination of interspecific OxG oil palm cultivars to promote fruit formation and development. However, limited information is available regarding its potential residues in refined palm oils, highlighting the need for reliable analytical methodologies for its monitoring. In this context, the present study aimed to develop and validate a method for the quantification of NAA in refined palm oils, based on liquid-liquid extraction with acetonitrile acidified with 0.2% (v/v) acetic acid, followed by analysis using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD).

Matrix effect evaluation showed a 33.7% suppression of the analytical response relative to calibration in solvent; therefore, matrix-matched calibration was employed to account for this effect during quantification. The method showed linearity over the range of 5–200 µg/L, with limits of detection and quantification of 2 and 5 µg/L, respectively. Recoveries ranging from 100.0 to 101.0% were obtained at the evaluated concentration levels, with precision values meeting the established acceptance criteria.

The validated methodology was applied to the analysis of 50 refined palm oil samples obtained from OxG cultivars, and NAA concentrations were below the limit of quantification in all samples analyzed. These results indicate the absence of quantifiable NAA residues in the evaluated oils under the current artificial pollination conditions and support the suitability of the developed method for the determination of this growth regulator in oil-based matrices.

---

*Degree project under the business internship modality.

**Faculty of Sciences. School of Chemistry. Chemistry. Director: Stellia Carolina Mendez, Ph.D. Co-director: José Leonardo Guerrero Niño, Chemist, M.Sc.

Introducción

En Colombia, la introducción de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) con fines comerciales se estableció en la segunda década del siglo XX desde África occidental, marcando el inicio de una transformación agroindustrial significativa. El establecimiento de este cultivo a escala industrial, sumado a su adaptación ecológica al ecosistema neotropical representó varios desafíos entomológicos y fitopatológicos que afectaban el rendimiento del cultivo. Para algunos de estos problemas fitosanitarios el conocimiento técnico se encontraba restringido a otras regiones productoras con condiciones agroecológicas distintas o en algunos casos, era inexistente. La limitada comprensión sobre las enfermedades letales como la pudrición del cogollo (PC) causada por el oomiceto *Phytophthora palmivora,* exclusiva de América, y el impacto de las plagas han contribuido a pérdidas sustanciales en la productividad, siendo la PC uno de los riesgos fitosanitarios más críticos para este cultivar (Genty & Ujueta, 2013).

En el año 2011 esta enfermedad afectó más de 30.000 y 15.000 hectáreas cultivadas en las regiones colombianas de Tumaco y Magdalena Medio, respectivamente (Genty & Ujueta, 2013). Investigaciones desarrolladas en Colombia, entre los años 1975 y 1985 demostraron que ciertos híbridos de Sinú x La Mé, eran resistentes a la PC; sin embargo, estos primeros cultivares generaron pérdidas económicas y su uso fue rechazado en los núcleos palmeros del país, debido a la baja tasa de extracción de aceite, consecuencia del deficiente llenado de los racimos. Por esta razón, la iniciativa de introducir cultivares híbridos no tuvo una acogida favorable en agroindustria de la palma. Como consecuencia, las investigaciones posteriores con nuevos materiales híbridos se mantuvieron a escala experimental hasta la segunda década del siglo XXI (Genty & Ujueta, 2013).

Partiendo de estos estudios, la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma), dirigió sus esfuerzos en alternativas para mitigar la PC y otras plagas, iniciando ensayos preliminares para el mejoramiento genético en la agroindustria de la palma colombiana mediante el desarrollo de cultivares con resistencia a enfermedades y plagas. Enfocándose en el cruce de diferentes especies de palma, obteniendo el cultivar híbrido OxG (*oleifera x guineensis*), producido a partir del cruce de la especie *Elaeis Guineensis* (originaria de África) con *Elaeis oleífera* (originaria de América) (Ruíz Álvarez et al., 2015). La introducción de este cultivar híbrido, en zonas afectadas por la enfermedad demostró mayor resistencia a la PC, evidenciando una incidencia de la enfermedad del 25 % en comparación con los cultivares de *Elaeis guineensis*, donde se reportó una mayor incidencia equivalente al 77 % (Alegría Lagos et al., 2015; Bello et al., 2022). No obstante, las ventajas agronómicas de los cultivares híbridos no fueron completamente satisfactorias. A medida que evolucionó el sistema productivo, se evidenció que la polinización natural se encontraba limitada debido a la baja producción de inflorescencias masculinas y la escasa atracción de polinizadores hacia dichas estructuras (García et al., 2020). Como consecuencia, se obtuvo un mayor número de inflorescencias abortadas y racimos pobres en frutos, lo que conllevó a tener menor cantidad de aceite extraído (Bravo, 2022).

Entre las alternativas para este inconveniente se propone la polinización asistida (aplicación de polen); no obstante, esta práctica resulta costosa y demandante, por lo que, se implementó la polinización artificial con la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal (RPG, por sus siglas en inglés) (García et al., 2020; Linares et al., 2019). Los RPG, son un grupo de reguladores de crecimiento vegetal de origen natural o sintético, involucrados en el control de los procesos fisiológicos de las plantas. Dentro de los RPG, se encuentran las auxinas, las cuales controlan el crecimiento de raíces y tallos, el cuajado del fruto y el

fototropismo. Un estudio realizado por Daza et al. (2021) evaluó el efecto de cuatro RPG (ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y etefón, precursor del etileno), sobre las inflorescencias con el objetivo de comparar su influencia fisiológica en el desarrollo de frutos en los racimos de palma. Este estudio logró identificar al ANA como el regulador más eficiente, aumentando el llenado del racimo en un 95% con aplicaciones entre 100 a 200 ppm. El 2,4-D, permitió el llenado de los racimos en un 80 % y en el caso del AIA y el etefón no alcanzaron el 50 % (Daza et al., 2021). Debido a estos hallazgos, Cenipalma ha implementado el uso del ANA en los cultivares híbridos OxG. Su aplicación sobre las inflorescencias durante el periodo de antesis ha mejorado las cosechas, reduciendo el aborto de flores, mejorando el llenado de los racimos y produciendo frutos partenocárpicos. Como resultado, la formación de estos racimos ha permitido incrementar la tasa de extracción entre el 25% y el 28 %, con rendimientos anuales superiores a las 10 toneladas de aceite por hectárea, sin necesidad de aumentar el área cultivada (Ochoa & Palacio, 2021; Romero et al., 2021a).

El ANA, es un regulador de crecimiento vegetal de origen sintético de tipo auxina, implicada en el control de procesos biológicos como la elongación celular, la germinación, la floración, el aclareo, el cuajado y tamaño del fruto (An et al., 2019). Además de la aplicación en la industria de palma de aceite, el ANA es utilizado por sí solo o en mezclas, sobre cultivos de uvas, tomates, manzanas, peras, nísperos, fresas, cocos y cítricos, obteniendo mayor productividad en las cosechas (Murillo Pulgarín et al., 2012; Ashburner et al., 1993). Al uso de los RPG sintéticos se le atribuyen mejoras significativas en el aumento de las cosechas, el incremento del tamaño del fruto y la reducción de la semilla, lo que resulta en productos más atractivos para el consumidor.

El ANA y sus sales de éster y acetato, pertenecen al grupo de los acetatos de naftaleno, estos RPG sintéticos, comparten una estructura química similar. Los acetatos de naftaleno presentan una categoría toxicológica III o IV (baja toxicidad), no presentan irritabilidad cutánea y no muestran efectos cancerígenos o mutagénicos, su comercialización como pesticidas, establece que sus efectos deben ser estudiados y regulados (Food Safety Authority, 2014). La Unión Europea (U.E) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA, de sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, presentan valores residuales máximos permitidos de ANA y sus derivados, en frutas, hortalizas y otros productos, entre 0,06-0,15 mg/kg (European Commission, 2016) y 0,01-2,0 mg/kg (Pamplany & Gordijn, 2023), respectivamente.

Ensayos realizados en ratas y humanos demostraron que el ANA ingerido sufre conjugación de su grupo carboxilo con ácido glucurónico o aminoácidos, en el hígado. En ratas, a bajas dosis (5 mg/kg), se forman principalmente conjugados con glicina en las mitocondrias hepáticas, mientras que a dosis más elevadas (50 mg/kg) predominan los conjugados glucurónicos. En humanos, este proceso ocurre exclusivamente mediante glucuronidación hepática, identificándose únicamente el metabolito 1-naftilacetil-glucurónido (Dixon, Caldwellf, et al., 1977a; Dixon, Caldwellf, et al., 1977b), por lo que su ingesta no produce compuestos peligrosos en el organismo (United States Environmental Protection Agency, 2019). Sin embargo, estudios advierten que la ingesta de ANA puede tener efectos perjudiciales para la salud, produciendo daño hepático, pubertad prematura y trastornos reproductivos (Elkins & Spiegelman, 2021; Li et al., 2024).

En las normativas, 40 CFR 180.155 del *Code of Federal Regulations* en Estados Unidos (Pamplany & Gordijn, 2023) y el Reglamento (CE) n.º 396/2005 en Europa (Food Safety Authority, 2014) sobre la calidad de los alimentos, han indicado sobre la necesidad de

desarrollar estudios para la determinación de compuestos residuales y contaminantes, potencialmente peligrosos y sus afectaciones en el organismo.

Los métodos disponibles para la determinación de ácido 1-naftalenacético (ANA) han sido desarrollados para matrices específicas; por ello, sus procedimientos de extracción y purificación varían en función de las características fisicoquímicas de la muestra. El primer método aplicado a una matriz oleosa fue reportado por Zweig et al. (1964) en aceitunas frescas; sin embargo, presentó recuperaciones entre el 50 y el 76 % y un límite de detección de 0,1 ppm. Posteriormente, Fan et al. (2011) desarrollaron un método por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem con Ionización por Electrospray para tejidos de colza, con recuperaciones del 85,8–99,8 %, aunque su validación se limitó a tejidos vegetales. Más adelante, Liu et al. (2015) describieron la primera metodología validada para aceites comestibles de soja, maíz, colza y girasol, usando como método de extracción la derivatización (N,N-dimetilformamida) asistida por microondas y como método analítico la cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por fluorescencia y acoplado a espectrometría de masas en tándem, para la confirmación y cuantificación, en este estudio se obtuvo un límite de detección de 0,37 ng/mL y recuperaciones del 96,1–104,4 %.

No obstante, hasta la fecha no se han reportado métodos validados para la determinación de ANA en aceite refinado de palma del híbrido OxG, pese a que este regulador de crecimiento se emplea en Colombia para favorecer la polinización asistida de los cultivares híbridos OxG. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar un método basado en extracción líquido-líquido y cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) para la determinación de ANA en aceite refinado de palma.

1. Planteamiento del problema

En el Magdalena Medio, Meta y Tumaco, la aplicación de ANA en cultivos del híbrido OxG ha mejorado el rendimiento en la producción de aceite de palma (Genty & Ujueta, 2013; Mosquera Montoya et al., 2021). Sin embargo, el ANA pertenece al grupo de los acetatos de naftaleno, clasificados internacionalmente como pesticidas regulados. Normativas como la 40 CFR 180.155 del *Code of Federal Regulations* en Estados Unidos (Pamplany & Gordijn, 2023) y el Reglamento (CE) n.º 396/2005 en Europa (Food Safety Authority, 2014) establecen límites máximos de residuos (LMR) para el ANA, sus metabolitos y productos de degradación, específicamente en frutas y productos vegetales destinados al consumo humano.

Actualmente, los marcos regulatorios para residuos de plaguicidas se enfocan principalmente en materias primas agrícolas y no contemplan de manera específica los productos procesados ni los subproductos derivados. Aunque se han establecido Límites Máximos de Residuos (LMR) para frutos frescos, incluidos frutos oleaginosos como la palma de aceite y el olivo, las normativas vigentes no incorporan explícitamente el efecto de los procesos de transformación sobre la concentración de residuos. Factores como la extracción, refinación, concentración o fraccionamiento pueden modificar significativamente los niveles de residuos presentes en productos derivados, tales como aceites, extractos, harinas, mermeladas, orujos o tortas de palmiste. En consecuencia, existe una incertidumbre regulatoria respecto a la aplicabilidad de los LMR establecidos para la materia prima a los productos y subproductos obtenidos mediante procedimientos industriales.

Aunque diversos estudios han confirmado la presencia de residuos de ANA en frutas y hortalizas tratadas durante el ciclo de cultivo, se desconoce su estabilidad, persistencia y comportamiento en matrices lipídicas complejas como el aceite crudo y refinado de palma. En este contexto, resulta prioritario establecer si los niveles residuales de ANA en aceites refinados provenientes del híbrido OxG se encuentran dentro de los márgenes de seguridad establecidos por las normativas vigentes.

2. Justificación

El ácido 1-naftalenacético (ANA) es una auxina sintética utilizada como regulador del crecimiento vegetal en diversas prácticas agrícolas. La presencia de ANA en productos alimenticios plantea interrogantes relevantes en materia de seguridad alimentaria, regulación internacional y control analítico.

Una matriz oleosa representa un desafío significativo para la cuantificación de ANA, debido a su baja polaridad, complejidad composicional y potencial interferencia en los procesos de extracción y detección. A pesar de los avances en métodos analíticos aplicados a frutas y vegetales frescos, existe una clara carencia de protocolos validados para la determinación de ANA en aceites comestibles.

Este estudio propone un método analítico estandarizado para la extracción y cuantificación de ANA en aceites refinados, empleando la extracción líquido-líquido y su determinación mediante HPLC-FLD. Está metodología desarrollada será validada conforme a la guía ICH Q2(R2) “Validation of Analytical Procedures-Guidance for Industry”, evaluando los parámetros de la selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud y la estimación de la incertidumbre.

La creciente preocupación por la presencia de residuos químicos en alimentos y el fortalecimiento de los requisitos regulatorios en materia de inocuidad han generado la necesidad de desarrollar metodologías analíticas sensibles, precisas y confiables para su monitoreo. Sin embargo, la determinación de ANA en matrices oleosas continúa siendo un área con limitada información científica y escasas metodologías validadas. Por ello, esta investigación busca aportar una herramienta analítica robusta para la cuantificación de estos compuestos en productos derivados de la palma de aceite (aceite refinado), generando conocimiento científico aplicable al control de calidad y el cumplimiento normativo. De esta manera, este estudio contribuye al fortalecimiento de las capacidades analíticas de la industria agroalimentaria y al aseguramiento de la inocuidad de los aceites destinados al consumo humano.

3. Objetivo

1.1 Objetivo general

- Estandarizar y validar una metodología analítica para la determinación y cuantificación de ácido 1-naftalenacético (ANA) en aceites refinados obtenidos a partir de aceite crudo de palma proveniente de cultivares OxG.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer una metodología de extracción del ácido 1-naftalenacético en aceites refinados.
- Estandarizar la metodología analítica para la determinación de ácido 1-naftalenacético mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD).
- Validar el método establecido para la determinación de ácido 1-naftalenacético en aceites refinados de palma.

- Cuantificar el contenido de ácido 1-naftalenacético (ANA) en aceites refinados provenientes del cultivar interespecífico OxG.

4. Marco teórico

1.3 Antecedentes

La llegada de la palma de aceite a Colombia se dio en la tercera década del siglo XX, con la introducción de semillas de *Elaeis Guineensis* por el botánico belga Florentino Claes (Corley & Tinker, 2015). En los primeros años fue sembrada con fines ornamentales, sin embargo, en el año 1949, la empresa United Fruit Company en el departamento del Magdalena, inició a cultivarla de forma comercial, iniciando así el desarrollo de las primeras plantaciones en la Hacienda Patuca (Bastidas et al., 2003). Posteriormente fueron fundadas plantaciones en Buenaventura (Estación Agroforestal del Pacífico), Antioquia (Finca las palmas) y se distribuyeron semillas a los departamentos de Tumaco, Villavicencio, Quibdó, Medellín y el país ecuatoriano (Bastidas et al., 2003; Vargas, 2002)

En los primeros años, las plantaciones tenían pocas hectáreas sembradas y solo hasta 1959 se estableció la primera gran plantación de palma africana en Indupalma. A finales de la década de los 60 e inicios de los 70 del siglo XX, inició el crecimiento de la industria palmera en Colombia y otras regiones de América. En consecuencia, el creciente cultivo de esta palma introducida produjo desequilibrios en los ecosistemas endémicos, lo que permitió a plagas silvestres y patógenas de otras palmas, adaptarse a la nueva especie. Durate cinco años de auge, estas amenazas fitosanitarias produjeron un retroceso en los cultivos, debido a las nuevas plagas desconocidas hasta el momento sobre la palma africana. Una de las enfermedades que más ha afectado a los cultivos de palma es la enfermedad de la PC, la cual

afectó seriamente la plantación de Coldesa en Urabá y en la Hacienda la Cabaña en los llanos orientales durante los años de 1965 y 1974 (Genty & Ujueta, 2013).

En el año 1974 el entomólogo francés Phillippe Genty estudiando a los defoliadores que afectaba la plantación de Unipalma en el departamento del Cesar-Colombia observó que la especie americana, *Elaeis Oleifera*, tenía interacciones planta-insecto distintas a las observadas en *Elaeis Guineensis*, esto le llevó a proponer el primer cruce genético. Este primer híbrido (híbrido sinú) sobrevivió a la ola de PC que afectó entre mil y dos mil hectáreas de cultivos de *Elaeis Guineensis* en Zona Norte y en las cercanías de la frontera panameña, lo que permitió establecer la viabilidad de los nuevos materiales genéticos en la industria de la palma (Genty & Ujueta, 2013).

De esta manera, los cruces genéticos de *Elaeis oleifera* (hembra), procedente del Sinú y *Elaeis guineensis* (Macho) permitieron obtener el híbrido interespecífico OxG. Este híbrido resultó ser resistente a la PC, la marchitez sorpresiva y otras plagas (Romero et al., 2022a). A pesar de sus ventajas, la deficiente formación de frutos y la poca producción de aceite desestimó los esfuerzos para continuar con el cultivo de este híbrido. Sin embargo, nuevos materiales como el de Corai procedente del Brasil y La Mé procedente de África permitieron obtener el cruce OxG (Corai x La Mé), la cual fue cultivada en Indupalma entre 1983 y 1984, obteniendo mejores resultados que el caso del Híbrido Sinú (Genty & Ujueta, 2013).

Este nuevo material genético fue introducido principalmente en las zonas más afectadas del país (Tumaco, Magdalena, los Llanos orientales y Urabá), donde demostró tolerancia a la PC y otras enfermedades transmitidas por insectos picadores-chupadores. Sin embargo, el híbrido presentó limitaciones asociadas con viabilidad polínica, lo que conllevó a una menor producción de aceite respecto a la obtenida con el material *E. Guineensis*. No

obstante, su adopción representó un hito importante para mitigar los efectos de la PC en los cultivos (Romero et al., 2022a).

Desde 1990 se han llevado a cabo, diversas investigaciones que han permitido optimizar el desarrollo de racimos en cultivares híbridos OxG mediante técnicas de polinización asistida, logrando tasas de extracción de aceite comparables a las obtenidas con *Elaeis guineensis*. En estudios realizados por Linares et al. (2019), el cual establecieron las ventajas de la polinización artificial sobre la asistida en materia de toneladas producidas y los costos asociados a ambas prácticas, donde se concluye que la polinización artificial permite obtener una taza de extracción entre el 23,6 % y 25,6 % en comparación con el 19,5 % y 20 % obtenido por la polinización asistida de las inflorescencias.

Actualmente se conocen cinco tipos de fitohormonas principales, involucradas en el desarrollo y el crecimiento de las especies vegetales; las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, el ácido abscísico junto con sus derivados, y el etileno, estas sustancias vegetales cumplen funciones puntuales y son potentes incluso en bajas concentraciones. La importancia de estos compuestos se fundamenta en su capacidad para intervenir en los procesos metabólicos, el tamaño y desarrollo de las células, la formación de órganos y regir los ciclos de vida en el reino vegetal confiriendo a las frutas y verduras sus propiedades y calidad (An et al., 2019; Sri Hari Babu et al., 2022).

Desde hace varios años, se utilizan los reguladores de crecimiento de origen natural y sintético en las plantas (RPG). En la agricultura, se utilizan productos principalmente sintéticos en bajas concentraciones, los cuales, actúan de forma similar a sus análogos endógenos o naturales, controlando procesos como el crecimiento y la reproducción de las plantas, potenciando el rendimiento de las cosechas (Sajjad et al., 2017; Wu et al., 2024). Asimismo, el uso de estas sustancias químicas ha mejorado la tolerancia de las especies

vegetales frente a plagas y enfermedades, reduciendo el uso de fertilizantes y de pesticidas lo que representa un efecto positivo para la economía y los ecosistemas biológicos (Wu et al., 2024).

1.4 Auxinas

Las auxinas son el primer grupo de fitohormonas descrito, este grupo de moléculas se caracterizan por tener bajo peso molecular y regular aspectos fisiológicos en las especies vegetales. Charles Darwin y Francis Darwin, propusieron la existencia de estas sustancias y describieron sus efectos, por primera vez, estudiando el fototropismo inducido sobre las plantas (Batista-Silva et al., 2024). Sin embargo, las características químicas de estas moléculas se entendieron hasta 1930, con la caracterización del ácido indol-3-acético (IAA). Esta primera auxina, encontrada en la orina humana, es la responsable del desarrollo antes, durante y después de la embriogénesis, en plantas (Batista-Silva et al., 2024). Estudios posteriores, demostraron que las auxinas sintetizadas por las plantas como el ácido fenilacético, el ácido 4-cloro-3-acético y el ácido indol-3-butírico, regulan la división celular, la formación de órganos, la biosíntesis de etileno, el desarrollo de raíces y la formación de hojas, la dominancia apical, la diferenciación de tejido vascular y el cuajado de frutos (O'Donnell et al., 2003; Siddiqui et al., 2016; Wang et al., 2013).

El uso de auxinas sintéticas desde la mitad del siglo XX y las selecciones genéticas artificiales han mejorado la producción de alimentos agrícolas, necesarios para suplir la demanda mundial. Uno de los procesos fisiológicos de mayor interés en la industria agrícola es el cuajado del fruto o formación del fruto. Este proceso inicia luego de la polinización exitosa del estigma y su desarrollo está regulado por fitohormonas, principalmente las auxinas. Por otro lado, el desarrollo del fruto puede llevarse a cabo sin la fertilización del óvulo con polen. A este proceso, se le conoce como partenocarpia, el cual, se ha estudiado ampliamente,

proponiendo así la fertilización artificial con auxinas, activando el crecimiento del fruto y estimulando la división y expansión celular, durante el cuajado (Vriezen et al., 2008; Wang et al., 2005).

1.5 Ácido 1-Naftalenacético

En la década de los 60 se incluyen nuevos compuestos derivados del naftaleno a la lista de pesticidas de uso comercial, entre ellos el ácido 1-Naftalenacético (ANA). Desde entonces se ha aplicado en cultivos de peras, manzanas, aceitunas, piña, cítricos, nísperos, coco y entre otros (Murillo Pulgarín et al., 2012).

La aplicación de ácido 1-naftalenacético (ANA) en inflorescencias del híbrido OxG es percibida por proteínas vinculadas a la señalización auxínica. La activación de respuestas transcripcionales ocurre en minutos u horas tras el tratamiento, incluyendo la modulación de quinasas tipo receptor (RLKs), de mensajeros secundarios como Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno (ROS). La señal auxínica conduce a la inactivación de miembros de la familia Aux/IAA, proteínas nucleares de vida media-corta que reprimen la transducción de señales. Como consecuencia, permanecen activos los factores de respuesta a auxinas (ARFs), que regulan la expresión génica, mediante su unión a elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) en regiones promotoras. Este mecanismo activa genes tempranos como Small Auxin Up RNA (SAUR), asociado al alargamiento celular, y Gretchen Hagen 3 (GH3), implicado en la homeostasis de auxinas (Montoya et al., 2023; Xing et al., 2023).

Entre los ARFs reguladores del cuajado destacan ARF7 y ARF8, cuya modulación tras el tratamiento con ANA altera la represión normal del desarrollo del ovario y permite el inicio del crecimiento partenocárpico. Estos factores controlan la expresión de genes relacionados con ciclinas, el citoesqueleto y expansinas, que en conjunto favorecen la

expansión del mesocarpio y del ovario. Sin embargo, la inducción partenocárpica no depende exclusivamente de la acción de las auxinas, sino también de su interacción con otras fitohormonas, en particular las giberelinas (GA). Se ha demostrado que el ANA regula genes asociados a la biosíntesis y señalización de GA, lo que refleja un crosstalk hormonal entre ambas vías. En este contexto, el ANA promueve la degradación de las proteínas DELLA, represores del crecimiento mediados por GA, liberando así los genes promotores de división y expansión celular necesarios para el desarrollo del fruto partenocárpico (Montoya et al., 2023).

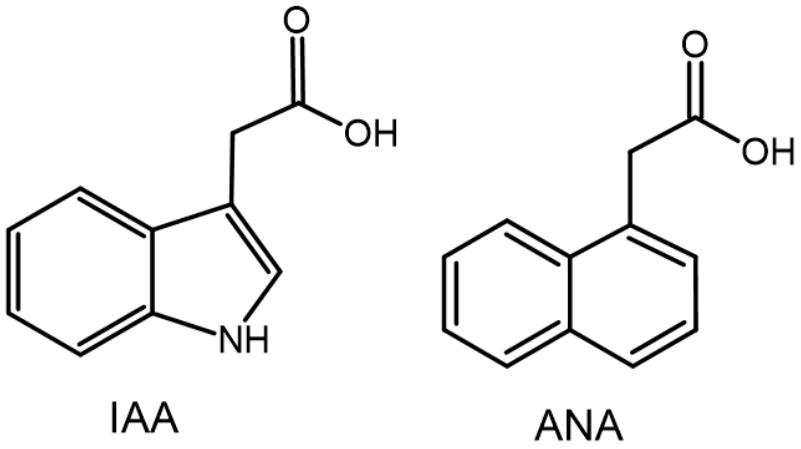
El ANA estimula la expresión de genes asociados al transporte y acumulación de carbohidratos, aumentando la "sink strength" del ovario y favoreciendo la formación del fruto en ausencia de semillas. No obstante, la aplicación de ANA también desencadena la expresión de genes relacionados con estrés, lo que sugiere que la partenocarpia inducida responde, al menos en parte, a una reprogramación de tipo defensivo más que a un proceso fisiológico idéntico al desencadenado por la fecundación (Montoya et al., 2023; Xing et al., 2023).

1.6 Aplicación del ANA en la agroindustria

El ANA se ha utilizado sobre cultivos de frutas y verduras, con diferentes propósitos. En soya, se usa como sustituto del ácido indol 3-acetico (AIA), su homologo natural, con el que comparte una estructura química semejante (**Figura 1**), debido a su mayor estabilidad, prolongada acción fisiológica y menor costo, mejorando la tolerancia de la soya al estrés hídrico (Xing et al., 2023). En arándanos y pepinos los frutos obtenidos evidencian aumento de tamaño y partenocarpia, respectivamente (Milić et al., 2018; Qian et al., 2018). En frutales, el uso de ANA ha permitido controlar los tiempos de cosecha evitando las pérdidas

ocasionadas por las heladas tempranas (Dal Santo et al., 2020; Ortolá et al., 1991; Yoshikawa et al., 1988).

Figura 1. *Fórmula estructural del ácido indol-3-acético (izquierda) y del ácido 1-naftalenacético (derecha).*



Nota. Figura de autoría propia.

Otros estudios, evidencian que la mezcla de ANA con otras sustancias genera efectos sinérgicos en plantas, en el cultivo de níspero al adicionar ANA y cloruro de calcio se observa un aumento el tamaño del fruto. En fresas, la combinación con fenotiol, mejora la fijación del fruto a la planta y potencia el contenido de antioxidantes (Amorós et al., 2004). Por otro lado, la producción de coco ha mejorado por la aplicación del ANA con sacarosa, estimulando el crecimiento radicular (Ashburner et al., 1993).

Para cultivos de palma de aceite se ha estudiado la aplicación de ANA en sólido y en solución. En Bravo et al. (2022), se evaluaron ocho tratamientos, de polinización artificial con el propósito de establecer diferencias entre las aplicaciones, en sólido, de ANA y polen, tanto de forma individual como combinada. Los resultados indicaron que el mayor llenado de frutos se obtuvo mediante la aplicación exclusiva de ANA en tres ciclos con una frecuencia de cada 2 días alcanzando un 37,2 % de aceite por racimo. No obstante, también se destacó

un tratamiento de interés en el que se realizó una aplicación inicial de polen durante el periodo de antesis, seguida de dos aplicaciones de ANA, el cual permitió obtener un 34,1 % de aceite por racimo, con una tasa de extracción de aceite del 25 %. Adicionalmente, aplicaciones comerciales de ANA en solución a 1200 ppm durante el periodo antesis y reforzadas a los siete y 14 días después de este periodo, también ha permitido establecer el llenado de los racimos en un 95 % y alcanzando una tasa de extracción de aceite del 28 % (Romero, 2018).

1.7 Regulaciones internacionales del ANA sobre productos agrícolas

El uso del ANA y sus derivados, en la agricultura ha generado cuestionamientos ambientales y de salud asociados principalmente a los productos agrícolas de consumo directo. El abuso de estos agroquímicos puede conllevar a consecuencias que pueden poner en riesgo el valor nutricional de los alimentos y la seguridad alimentaria de la población. Además de los potenciales daños provocados a los ecosistemas por acumulación de esta sustancia exógena sobre los organismos vivos (Li et al., 2024).

El ANA es clasificado como un compuesto de baja toxicidad, lo que ha facilitado su uso extendido en aplicaciones agrícolas. Hasta la fecha no hay estudios concluyentes que demuestren o descarten efectos mutagénicos y carcinogénicos. No obstante, esta falta de evidencia no debe interpretarse como la ausencia de riesgos por lo que se requiere de una evaluación toxicológica más exhaustiva. Por otro lado, De acuerdo con la European Food Safety Authority (EFSA), aún faltan estudios que permitan establecer todos los posibles efectos producidos por los acetatos de naftaleno en el organismo (Food Safety Authority, 2014).

La posible acumulación de estos compuestos en frutas, verduras y productos agrícolas de consumo humano, sumada a su naturaleza pesticida, ha motivado la implementación de regulaciones internacionales destinadas a limitar sus concentraciones de manera preventiva.

Entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la EPA de los Estados Unidos y la U.E regulan la presencia del ANA y sus derivados, en alimentos de consumo directo (European Commission, 2016; Pamplany & Gordijn, 2023). En la **Tabla 1** se presentan las concentraciones máximas permitidas de ANA en diversas frutas comerciales, conforme a las normativas internacionales vigentes. Si bien el aceite refinado de palma no está explícitamente regulado en estos marcos, su análisis resulta pertinente, dado que constituye el producto final de consumo humano, derivado de la fruta de palma. En el caso del híbrido OxG, ni la fruta ni el aceite crudo se comercializan para consumo directo, lo que posiciona al aceite refinado como la principal fuente de posible contaminación por esta fitohormona.

Tabla 1. *Valores máximos permitidos para el ácido 1-naftalenacético en algunas frutas y productos de consumo humano de acuerdo con la EPA y la U.E*

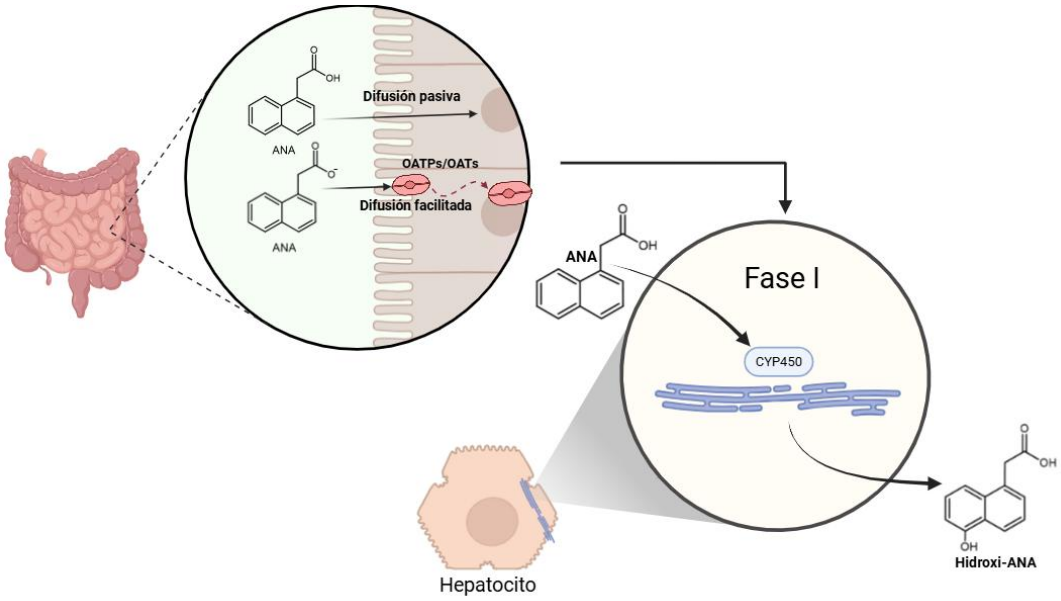
Producto agrícola	LMR según U.E (mg/kg)	LMR Según la EPA (mg/kg)
Manzana	0,15	0,15
Olivas	0,06	0,70
Peras	0,15	0,15
Piña	0,06	0,05
Naranja	0,06	0,10
Aguacates	0,06	0,05
Fruta de palma	0,06	0,10

1.8 Metabolismo de ANA

Los ácidos arilacéticos (Ar–CH_2–COOH, donde el Ar es el grupo arilo que puede ser de tipo fenilo o naftilo como el 1-ANA) son metabolizados principalmente mediante

conjugación del grupo carboxilo con ácido glucurónico o aminoácidos (Dixon, Caldwellf, et al., 1977a) (ver **Figura 2**).

Figura 2. *Ruta metabólica de biotransformación de ANA en humanos y ratones Fase I.*



Nota. Figura de autoría propia realizada a partir de los datos de Dixon, Caldwellf, et al. (1977).

Según Dixon et al. (1977), tras la administración oral de 5 mg de 1-ANA-^{14}C en voluntarios humanos (Dixon, Caldwell, et al., 1977b) pudieron evidenciar en el estudio

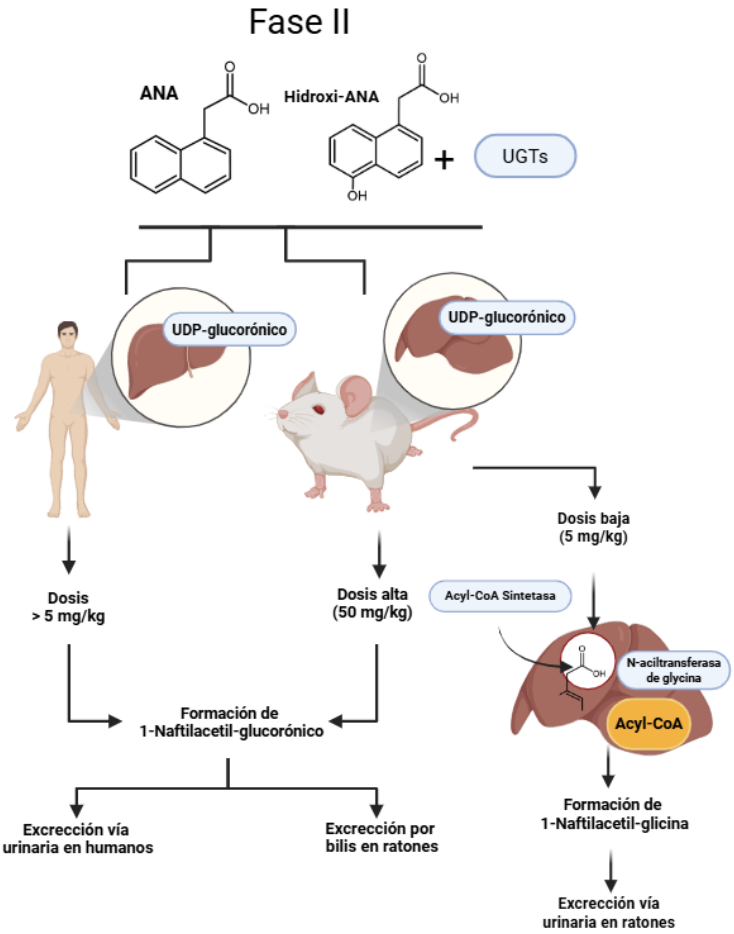
- Más del 95 % del marcado isotópico fue excretado por orina en 24 horas.
- Se identificó un único metabolito: 1-naftilacetil-glucurónido.
- No se detectaron conjugados con glicina, glutamina ni taurina.

El metabolismo en humanos está mediado casi exclusivamente por glucuronidación hepática, probablemente catalizada por UGTs (Uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferasas), un grupo de enzimas clave en la fase II del metabolismo de xenobióticos, en las microsomas hepáticas. Investigaciones basadas en el metabolismo del 1-ANA en ratas con distintas dosis

(5 a 500 mg/kg) se determinó que (Dixon, Caldwellf, et al., 1977a; Dixon, Caldwellf, et al., 1977b):

- A bajas dosis (5 mg/kg):
    - Predominó la conjugación con glicina en mitocondrias hepáticas (~88 % en orina).
    - También se detectó el glucurónido (~15 %) en bilis.
- A altas dosis, la glicinación se saturó y aumentó la proporción de glucuronidación, ver **figura 3**.

Figura 3. *Conjugación metabólica del ANA en humanos y ratones Fase II.*



Nota. Figura de autoría propia realizada a partir de los datos de Dixon, Caldwellf, et al. (1977).

La EFSA ha establecido un límite seguro de ingesta diaria aceptable (ADI) para el ANA y sus derivados de 0,1 mg/kg de peso corporal por día, valor que corresponde a la cantidad máxima que una persona puede ingerir de manera continua a lo largo de su vida sin presentar efectos adversos. Asimismo, se ha definido una dosis de referencia aguda (ARfD) de 0,1 mg/kg de peso corporal, considerada como la exposición máxima admisible en una sola ingesta sin riesgo para la salud.

Aunque los estudios de metabolismo del ANA en ratas y humanos indican que no se forman metabolitos tóxicos de relevancia, tanto la EFSA como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) señalan la necesidad de investigaciones adicionales que permitan confirmar de manera concluyente la inocuidad de esta molécula y sus derivados. La estricta regulación internacional se fundamenta en su potencial clasificación como compuesto de riesgo y en su uso como fitorregulador catalogado dentro del grupo de los pesticidas.

1.9 Métodos analíticos para la determinación de ANA

Países y regiones como Estados Unidos y la Unión Europea reflejan una aplicación estricta y altamente regulada de los límites máximos de residuos en insumos agrícolas (frutas y hortalizas), orientados a garantizar la inocuidad alimentaria y la protección de la salud humana. Estas disposiciones han impulsado el desarrollo de investigaciones enfocadas en la implementación de metodologías analíticas para la determinación de estos contaminantes y la evaluación de sus posibles efectos en los organismos vivos.

1.10 Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos destacan por su alta sensibilidad y selectividad. Sin embargo, las muestras requieren de un pretratamiento, el cual depende de la capacidad de extracción de los analitos en matrices complejas. Dentro de los métodos cromatográficos registrado en la literatura para la cuantificación de ANA, se encuentran la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, de sus siglas en inglés) acoplada a diversos detectores en los que podemos encontrar, detector de florescencia (FLD) (Lu et al., 2016), arreglo de diodos (DAD) (Watanabe et al., 2007) y espectrometría de masas (MS) (Bisht et al., 2021). También hay reportes donde utilizan la cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y detector de ionización de llama (FID) (Liu et al., 2022). Una de las ventajas que tiene los detectores de masas es su alta selectividad, debido a que pueden monitorear moléculas sin tener interferencias. Otra de las ventajas de los métodos cromatográficos es su alta selectividad en matrices complejas, como lo son los alimentos, frutos y otras matrices. En las metodologías de preparación de muestras para análisis por técnicas cromatográficas suelen llevarse a cabo algunos procesos de purificación o extracción del analito. En el análisis de PRG, los más utilizados son las extracciones líquido-líquido, extracción en fase sólida, y el método QuEChERS, utilizado por su eficiencia y versatilidad (Zhang et al., 2017).

1.10.1 Métodos electroquímicos

Las técnicas electroquímicas destacan por su alta sensibilidad, eficiencia y practicidad. Aunque la aplicación de métodos electroquímicos ha sido limitada en la determinación del ANA, estudios previos han reportado bajos límites de detección hasta los 0.09 µg/mL (Janíková et al., 2020). No obstante, dado que estas metodologías permiten la determinación simultánea de otros RPG, su selectividad puede verse comprometida. Sin

embargo, los métodos electroquímicos presentas ventajas en términos de costos y simplicidad de operación en comparación con las técnicas cromatográficas (Janíková et al., 2020).

Entre los métodos electroquímicos desarrollados, se ha reportado el uso de electrodos de diamante dopados con boro para la medición de señales anódicas de oxidaciones irreversibles, derivadas de la capacidad electroquímica del ANA. Estos análisis electroquímicos no requieren una preparación laboriosa de la muestra ni procesos adicionales de purificación, lo que convierte a esta técnica en una alternativa práctica. Sin embargo, es importante señalar que el estudio propuesto por Janíková, L. et al (2020) se realizó en muestras de herbicidas y no sobre matrices de frutas o verduras. Este estudio se planteó como una alternativa al inmunosensor electroquímico de ANA, el cual, presenta desventajas asociadas a su mayor costoso, complejidad en la preparación y tiempos prolongados de análisis (Liang et al., 2015).

1.10.2 Métodos fluorimétricos

Los métodos fluorimétricos han ganado relevancia en los últimos años debido a su rapidez, selectividad y bajos límites de detección. Principalmente empleados en la determinación de iones metálicos y aminoácidos. Sin embargo, en la actualidad estos métodos son limitados, a pesar de sus ventajas en términos de bajos costos operativos y alta sensibilidad para la detección de ANA (Li et al., 2020).

Una alternativa prometedora en este campo es el uso de nanopartículas fluorescentes dopadas con cobre, las cuales han sido una alternativa para la adsorción del ANA. Los trabajos de Li et al. (2020) y Nikolelis et al. (2008) demuestran que la fluorescencia constituye una alternativa viable, sensible y ambientalmente amigable para la detección de ANA en matrices vegetales, ya sea mediante nanopartículas dopadas con cobre o sensores de

película lipídica con receptores de auxinas. En la tabla 2 se observan algunos de los métodos más usados para la determinación de ANA en diversas matrices.

Tabla 2. *Métodos desarrollados para la detección y cuantificación de ANA, en diversas matrices*

Técnica analítica	Condiciones	Método de extracción	Muestras	Ref.
HPLC-FLD	Fase móvil: ACN: H2O 50:50 Flujo: 1.0 mL/min Temperatura: 35 °C	Microextracción líquido-líquido, dispersiva. Solvente de extracción: Cloroformo (50 µL) Solvente dispersante: Acetona (1 mL)	Hojas de durantas	(Lu et al., 2016)
UPLC-MS/MS	Fase móvil A: H_2O + 0.1 % ácido fórmico + 20 mM acetato de amonio. Fase móvil B: Metanol. Flujo: 0.25 mL/min Temperatura: 30 °C	Extracción líquido-líquido y purificación con QuEChERS. Disolvente de extracción: Acetonitrilo Acidificado al 1 % con ácido fórmico (10 mL).	Plantas medicinales y hongos.	(Qiu et al., 2024)
UHPLC-MS/MS	Fase móvil A: Metanol Fase móvil B: H_2O acidificada al 2mM con ácido acético. Flujo: 0.6 mL/min Temperatura: 50 ° C	Extracción líquido-líquido. Solvente de extracción: Acetato de etilo (10 mL). Reconstitución: 1 mL de metanol.	Manzanas	(Esparza et al., 2013)
HPLC-MS/MS	Mezcla isocrática: Acetonitrilo: H_2O (70:30) Flujo: 0.2 mL/min Temperatura: 30 ° C	Extracción líquido-líquido y purificación con QuEChERS. Solvente de extracción: Acetonitrilo (10 mL)	Ajo y suelo	(Guan et al., 2011)
HPLC-UV	Mezcla isocrática: Metanol: H_2O acidificado al 0.5 % con ácido fórmico (55:45) Flujo: 1.0 mL/min	Extracción magnética en fase sólida (MSPE) y desorción en 1 mL de acetonitrilo acidificado al 5 % con ácido trifluoroacético.	Jugos frescos de pera, tomate y melocotón	(Li et al., 2024)
GC-FID	Gas portador: Helio Flujo: 2.56 mL/min	Extracción en fase sólida PSE y derivatización con BSTFA-TMCS* Solvente de extracción: 50 mL de Metanol	Baya de cera, manzanas, repollo y Brócoli	(Wang, 2019)

Voltamperometría	Electrolito soporte: Ácido sulfúrico (0,6 M) Cosolvente: etanol 30 %.	La muestra es pulverizada y disuelta en 100 mL de etanol 96 % del que se toman 10 mL para ser analizados directamente en celda.	Herbicidas comerciales	(Janíkov á et al., 2020)
Espectroscopía de fluorescencia	Mezcla precursora (PVP-MBT-$NaBH_4$**)	Incubación a 30°C en mezcla precursora con nanopartículas de cobre	Manzanas	(Li et al., 2020)

Nota. * N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (reactivo de silación).

** Polivinilpirrolidona (PVP), 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y borohidruro de sodio ($NaBH_4$)

1.11 Validación de metodologías analíticas.

El desarrollo de una metodología analítica comprende la optimización de las condiciones experimentales y su correspondiente validación. La validación tiene como finalidad demostrar que el procedimiento es adecuado para la detección y cuantificación del analito de interés y que genera resultados confiables dentro del intervalo de concentraciones establecido. Para ello, se evalúan parámetros de desempeño como la exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y estabilidad (Ahumada et al., 2023; Union et al., 2002).

1.12 Parámetros de validación

1.12.1 Selectividad

Esta es la determinación de qué tan adecuado es el método para realizar la cuantificación o determinación de un analito específico sin verse afectado por interferentes o impurezas presentes en la muestra (Ahumada et al., 2023). Esta se puede establecer realizando el procedimiento sobre muestras que contengan los interferentes, pero no, el analito de interés, es decir, blancos de muestras. Se puede realizar una comparación utilizando blancos de muestra y blancos fortificados.

$$Error\ (\%) = \frac{|C_{bk\ fortificado} - C_{bk\ muestra}|}{C^{*}_{bk\ fortificado}} * 100 \quad (1)$$

Donde:

$C_{bk\ fortificado}$, es la concentración obtenida de la medición del blanco fortificado.

$C_{bk\ muestra}$, corresponde a la concentración obtenida del blanco de la muestra.

$C^{*}_{bk\ fortificado}$, es la concentración añadida al blanco fortificado.

En el caso de métodos que permiten análisis robustos como los cromatográficos, se se recomienda tener una resolución por encima de 1.5 entre el analito de interés y los posibles interferentes, garantizando así una separación adecuada que permita una cuantificación confiable.

1.12.2 Rango de linealidad

El rango lineal de un método analítico corresponde al intervalo de concentraciones en el cual la señal del sistema de detección mantiene una relación directamente proporcional con la cantidad de analito presente. Este parámetro se determina mediante una curva de calibración construida con soluciones estándar (ver ecuación 2), y se verifica mediante criterios estadísticos como el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (R^2), el análisis de residuos y la pendiente de la recta.

$$y = x * m + b \quad (2)$$

Donde:

y, corresponde a la ordenada de las áreas, o la respuesta instrumental.

x, corresponde a la concentración.

m, el valor de la pendiente de la recta.

b, la ordenada al origen.

La correcta delimitación del rango lineal permite establecer los límites operativos del método, evitando zonas de saturación o pérdida de sensibilidad. Su adecuada demostración es esencial para garantizar la validez de las mediciones cuantitativas en estudios de estabilidad, control de calidad y aplicaciones reguladas, ya que fuera de este intervalo pueden presentarse desviaciones sistemáticas que comprometen la exactitud del resultado (Union et al., 2002).

1.12.3 Límite de detección (LOD)

El límite de detección corresponde a la menor concentración del analito que puede ser detectada de forma inequívoca por el método analítico, aunque no necesariamente cuantificada con precisión y exactitud aceptables. A estas concentraciones, el sistema instrumental puede generar una señal reconocible, pero con variabilidad significativa que limita su uso para fines cuantitativos (Swartz & Krull, 2012).

El LOD se estima mediante la relación señal-ruido (S/N), especialmente en métodos cromatográficos o espectroscópicos donde el ruido de línea base es relevante. Esta relación se calcula comparando la intensidad de la señal del analito con la variabilidad del ruido en una región libre de analito. Se considera que una señal es detectable cuando la relación S/N es igual o superior a 3:1, lo que indica que la señal sobresale claramente del fondo instrumental (ver ecuación 3) (Swartz & Krull, 2012).

$$LOD = \frac{S}{N} = \frac{Respuesta\ de\ muestra\ a\ concentración\ baja}{Respuesta\ de\ ruido\ de\ fondo} \geq 3 \qquad (3)$$

Alternativamente, el LOD puede establecerse mediante análisis de replicados en concentraciones bajas, definiendo como LOD aquella concentración cuya señal sea reproducible, pero con un coeficiente de variación (% C. V) superior al umbral aceptado para cuantificación (por ejemplo, % C. V > 15%). Este coeficiente de variación se calcula a partir de la ecuación 6 (Swartz & Krull, 2012).

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \tag{4}$$

Donde:

$\bar{x}$, es el promedio calculado para las, n, mediciones realizadas.

$\sum_{i=1}^{n} x_i$, corresponde a la sumatoria de los valores individuales x_i medidos.

n, es el número total de mediciones realizadas.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i-\bar{x})^2}{n-1}} \tag{5}$$

Donde:

$\sum(x_i - \bar{x})^2$, corresponde a la sumatoria de los cuadrados obtenidos de la diferencia entre los valores individuales medidos x_i y el promedio $\bar{x}$ calculado de la ecuación 4.

s, es el valor de la desviación estándar.

$$\%\ C.V = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) * 100 \tag{6}$$

En la ecuación:

% C. V, es el coeficiente de variación expresado como porcentaje, obtenido de la razón entre la desviación estándar y el promedio.

s, es el valor de la desviación estándar calculada de la ecuación 5.

$\bar{x}$, es el valor promedio calculada de la ecuación 4.

1.12.4 Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación corresponde a la concentración más baja del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud confiables, bajo las condiciones experimentales del método. A diferencia del límite de detección, el LOQ garantiza no solo la presencia del analito, sino también su medición reproducible y estadísticamente válida.

Su estimación puede realizarse mediante la relación señal/ruido (S/N), considerando una proporción mínima de 10:1 entre la altura de la señal del analito y la del ruido de línea base, obtenido al medir un blanco (Swartz & Krull, 2012).

$$LOQ = \frac{S}{N} = \frac{Respuesta\ de\ muestra\ a\ concentración\ baja}{Respuesta\ de\ ruido\ de\ fondo} \geq 10 \qquad (7)$$

Además, el LOQ puede establecerse empíricamente mediante análisis de replicados en concentraciones bajas, definiendo como LOQ aquella concentración que cumple con criterios de precisión % C. V ≤ 15% y exactitud dentro de un rango aceptable de recuperación entre 85–115% (Swartz & Krull, 2012).

1.12.5 Exactitud

La exactitud de un método analítico se refiere al grado de concordancia entre el valor medido y el valor verdadero o nominal del analito. Esta concordancia se cuantifica mediante el error relativo, que permite evaluar el sesgo sistemático del método (Swartz & Krull, 2012).

El error relativo (%) se calcula como:

$$\%\ Error\ relativo = \left(\frac{C_{medida} - C_{teórica}}{C_{teórica}}\right) * 100 \quad (8)$$

Donde:

C_{medida}, es la concentración obtenida de la medición del blanco fortificado.

$C_{teórica}$, es la concentración añadida al blanco fortificado.

Este parámetro expresa la desviación porcentual del resultado respecto al valor esperado. Valores cercanos a cero indican alta exactitud, mientras que desviaciones positivas o negativas reflejan sobreestimación o subestimación del analito, respectivamente.

En estudios de validación, el error relativo se evalúa en múltiples niveles de concentración (bajo, medio y alto), utilizando muestras dopadas en matriz libre del analito. La guía ICH Q2(R1) establece que la exactitud es aceptable cuando el error relativo se encuentra dentro de: ± 15 % para niveles medio y alto y ± 20 % para el nivel más bajo (LOQ) (Miller, 1993). En matrices complejas, el valor de la exactitud puede verse directamente afectada por el efecto matriz donde se puede producir la supresión (disminución de la respuesta analítica) o el realce (aumento de la señal analítica) de la respuesta del detector. Estos efectos pueden determinarse mediante la siguiente ecuación:

$$\%\ Efecto\ matriz = \left(1 - \frac{Señal\ en\ matriz}{Señal\ en\ solvente}\right) * 100 \quad (9)$$

1.12.6 Precisión

La precisión es una medida del grado de concordancia entre resultados independientes obtenidos al aplicar el mismo método analítico sobre un objeto de estudio, bajo condiciones previamente establecidas. Este parámetro refleja la dispersión de los valores medidos y está directamente influenciado por la distribución de los errores aleatorios, los cuales pueden originarse por variaciones en el ambiente, el instrumental, la concentración de los analitos, el tiempo entre mediciones y la destreza del analista (Cantwell, 2025).

La precisión se expresa cuantitativamente mediante la desviación estándar (SD) o el coeficiente de variación (% C.V), y su evaluación requiere un número suficiente de replicados que permita representar adecuadamente la variabilidad del sistema. Según las recomendaciones de EURACHEM, se sugiere realizar al menos 10 repeticiones para obtener estimaciones confiables de la precisión, especialmente en estudios de repetibilidad y reproducibilidad (Cantwell, 2025). De esta manera, la precisión se establece mediante el valor del coeficiente de variación calculado con la ecuación 6.

1.12.7 Veracidad-recuperación

La recuperación se define como el grado de concordancia entre el valor obtenido por un método analítico y el valor verdadero o aceptado como referencia. Representa la capacidad del método para generar resultados libres de sesgo sistemático, y constituye un componente esencial de la exactitud en la evaluación del desempeño analítico.

En ausencia de materiales de referencia certificados, la veracidad puede establecerse mediante estudios de recuperación en muestras fortificadas. Este enfoque consiste en

adicionar cantidades conocidas del analito a una matriz representativa, aplicar el método bajo condiciones controladas, y calcular el porcentaje de recuperación como estimador indirecto de veracidad. Recuperaciones cercanas al 100 % indican una baja desviación sistemática y, por tanto, una alta veracidad (Swartz & Krull, 2012).

$$\%\, Recuperación \;=\; \left(\frac{Cantidad\ medida}{Cantidad\ adicionada}\right) * 100 \qquad (10)$$

1.12.8 Robustez

La robustez de una metodología analítica es la determinación de qué tanto se pueden variar algunas condiciones, de manera deliberada, del protocolo sin que se vean afectados los resultados obtenidos durante el ensayo (Ahumada et al., 2023; Swartz & Krull, 2012). Algunos de los parámetros sujetos de variación en una metodología cromatográfica, por citar algunos, son la composición de las fases móviles, los disolventes utilizados y sus cantidades, la temperatura, el caudal, la longitud de onda, el gradiente entre otros.

1.12.9 Incertidumbre

La incertidumbre de medición se define como el parámetro que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse al mensurando y establece un intervalo dentro del cual se espera que se encuentre el valor verdadero con un nivel de confianza determinado. Para la estimación de la incertidumbre se consideran como principales fuentes, la repetibilidad del método, la calibración instrumental y el uso de materiales de referencia. Una manera de expresar este resultado es en términos de la incertidumbre expandida la cual se calcula con la ecuación 15 y se entiende como la combinación de aquellas fuentes que suman a la incertidumbre o la dispersión de la medición analítica lo que permite reportar resultados

trazables y metrológicamente confiables para la cuantificación de ANA (Swartz & Krull, 2012).

A continuación, se desarrollan las fórmulas para calcular el valor de la incertidumbre en cada nivel de concentración, s_n.

Para ensayos realizados en distintos días se puede establecer la repetibilidad combinada con la siguiente ecuación:

$$s_n = \sqrt{\frac{({s_1}^2 + {s_2}^2 + {s_3}^2)}{p}} \quad (11)$$

Donde:

$({s_1}^2 + {s_2}^2 + {s_3}^2)$, corresponde a la suma de cada una de las incertidumbres ${s_i}^2$, obtenidas para el mismo nivel de concentración en días distintos.

p, corresponde al número de días en los que se realiza el mismo ensayo.

A continuación, se muestra la fórmula para la determinar la desviación media de las concentraciones promedio por nivel, evaluada para cada día (desviación estándar entre días, s_{IP}):

$$s_{IP} = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x}_i - \bar{x})^2}{p-1}} \quad (12)$$

Se tiene que:

$(\bar{x}_i - \bar{x})^2$, responde a la diferencia de cuadrados entre el valor de concentración promedio $\bar{x}_i$, obtenido en un día i, y el valor promedio de los tres días para un nivel en particular.

Con los cálculos realizados en las ecuaciones 11 y 12 se puede calcular el valor de la incertidumbre total del método por nivel de concentración, $s_{t,n}$:

$$s_{t,n} = \sqrt{{s_n}^2 + {s_{IP}}^2} \quad (13)$$

p, es el número de días en los que se repite el ensayo.

Cálculo de la incertidumbre estándar del promedio:

$$u = \frac{s_{t,n}}{\sqrt{n}} \quad (14)$$

Se tiene que:

$s_{t,n}$, es el valor de la desviación estándar calculada de la ecuación 13.

$\sqrt{n}$, es la raíz cuadrada del número de mediciones realizadas.

Expresión matemática para el cálculo de la incertidumbre relativa:

$$\%\, U = \frac{U}{\bar{x}} \quad (16)$$

La ecuación anterior está expresada en términos de U, la incertidumbre extendida y $\bar{x}$, el promedio de los datos medidos.

Cálculo de la incertidumbre extendida U, con k = 2

$$U = k * u \quad (15)$$

Está dada por:

k, es el valor de cobertura correspondiente al 95 % de confianza.

u, incertidumbre estándar del promedio calculada de la ecuación 14.

Representación de los resultados:

$$\bar{x} \pm U \quad (16)$$

Donde:

$\bar{x}$, es el valor promedio calculada de la ecuación 4.

U, es la incertidumbre expandida obtenida de la ecuación 15.

5. Metodología

En el marco del Programa de Procesamiento y Usos de Cenipalma, en la sede del Campo Experimental Palmar de las Corocoras, se desarrolló y estandarizó una metodología analítica para la determinación de ANA en aceites refinados. Hasta la fecha, no se han reportado procedimientos validados para la cuantificación de ANA en aceite refinado de palma, lo que representa un desafío analítico debido a la complejidad de esta matriz. Considerando que el uso agronómico del ANA en cultivos de palma de aceite es exclusivo de Colombia, la metodología propuesta constituye un aporte novedoso y de relevancia nacional para el monitoreo de residuos de este regulador de crecimiento vegetal.

1.13 Materiales

1.13.1 Reactivos

- Ácido 1-naftalenacético (ANA, pureza ≥95.0 %, Supelco, lote BCCJ6348).
- Metanol (grado HPLC, Supelco, lote L1355018429).
- Acetonitrilo (grado HPLC, Supelco, lote L1386830 502).
- Ácido acético glacial (Supelco, lote K55687463 351).
- Agua tipo I (grado HPLC, Supelco, lote Z0961833 445).

1.13.2 Equipos

- Balanza analítica marca OHAUS Pionner^{MT}.
- Centrifuga marca Sigma.
- HPLC-FLD marca Agilent.
- Plancha de agitación marca VELP Scientifica.

1.13.3 Materiales

- Tubos de ensayo
- Agitadores magnéticos de estrella
- Micropipetas de 100-1000, 10-100, 1-10 de la marca Brand.
- Eppendorf de 2 mL.
- Balón aforado de 2 mL.
- Viales ámbar de 2 mL.

1.14 Desarrollo y optimización del método

Durante la fase de optimización se evaluaron cuatro disolventes de extracción: acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), acetonitrilo acidificado (ACN-H^+) y metanol acidificado (MeOH-H^+), estos dos últimos ajustados al 0,2 % (v/v) de ácido acético (AcOH). La inclusión de solventes acidificados se justificó en función del valor de pKa del ANA (entre 4,29 y 4,24).

Las fases móviles fueron seleccionadas con base en la bibliografía existente para la determinación de ácido 1-naftalenacético (ANA). De acuerdo con Esparza (2013) y Ma & Zhang (2013), el uso de metanol (MeOH) como fase orgánica y una disolución acuosa acidificada con ácido acético (AcOH), resultan adecuados para la separación cromatográfica de este compuesto. En particular, Ma y Zhang (2013) recomiendan el empleo de la columna RP-Poroshell 120 EC-C18, la cual fue adoptada en la presente validación.

Las condiciones cromatográficas como el flujo, la temperatura de la columna y el gradiente de elución fueron optimizadas experimentalmente con el fin de lograr una adecuada resolución del ANA frente a posibles analitos interferentes

La comparación entre los distintos sistemas se efectuó con base en los porcentajes de recuperación obtenidos tras la fortificación de la matriz oleaginosa (*E. guineensis*) en tres niveles de concentración representativos: 5 µg/L (bajo), 40 µg/L (medio) y 160 µg/L (alto). Este diseño experimental permitió definir las condiciones de extracción más adecuadas, asegurando la selectividad, exactitud y reproducibilidad del método en una matriz oleosa.

1.14.1 Fases móviles

Fase A: solución acuosa acidificada a 0,1 % con ácido acético glacial.

Fase B: metanol (MeOH) grado HPLC al 100 %.

1.14.2 Stock de ANA

Se pesaron 2,58 mg de ácido 1-naftalenacético (ANA) para preparar una solución stock en cloroformo. A partir de esta se prepararon dos soluciones intermedias de 100 mg/L y 4 mg/L. Posteriormente, mediante la dilución de la solución de 100 mg/L, se obtuvo una solución de 400 µg/L. Las soluciones de 4 mg/L y 400 µg/L se utilizaron para la elaboración de la curva de calibración en concentraciones de 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 160 y 200 µg/L.

1.15 Condiciones cromatográficas

El análisis de ANA en aceites refinados se realizó en un equipo HPLC 1260 infinity II de Agilent, con muestreador automático, bomba cuaternaria, desgasificador y detector de fluorescencia. Para la fase estacionaría se utilizó una columna de fase reversa InfinityLab

Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 100 mm, 2.7 µm de la marca Agilent) mantenida a una temperatura de 35 °C.

El análisis cromatográfico se realizó con un flujo de 0.600 mL/min, con el siguiente gradiente de elución:

Tabla 3. *Gradiente de elución usado para la separación cromatográfica de ANA.*

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0,00	80	20
4,00	50	50
13,00	40	60
17,00	20	80
18,00	80	20
22,00	80	20

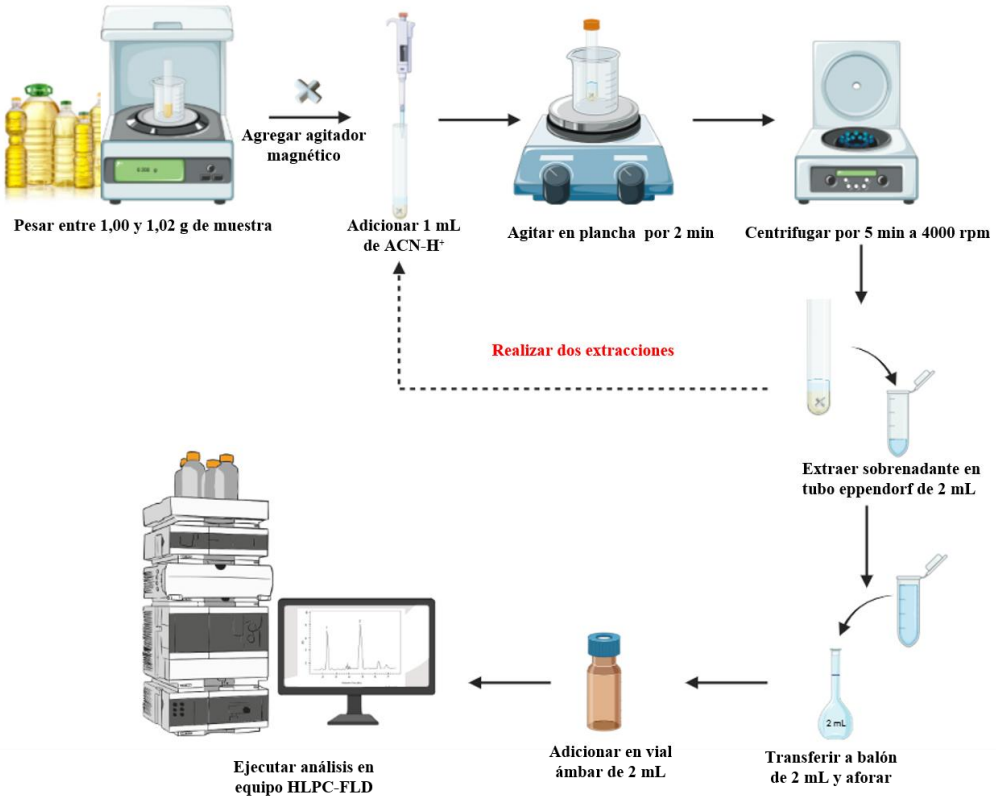
1.16 Preparación de la muestra

Las muestras de aceite de palma refinado fueron suministradas por una planta refinadora ubicada en la zona oriental. Se garantizó que las muestras correspondieran al aceite obtenido al final del proceso de refinación de aceite crudo de palma proveniente de frutos del cultivar híbrido OxG.

Para la preparación de la muestra se pesaron aproximadamente 1,00 g de muestra de aceite refinado previamente homogeneizado en un tubo de ensayo de 10 mL. A continuación, se adicionó 1,0 mL de acetonitrilo acidificado con ácido acético al 0,2 % (v/v) y se agitó durante 2 minutos con barra de agitación, con el fin de garantizar la completa dispersión de la matriz y promover la transferencia del analito hacia la fase orgánica. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, permitiendo la separación de fases; la fase orgánica (sobrenadante) se recuperó cuidadosamente y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL. El

proceso de extracción se realizó por duplicado; las fracciones orgánicas obtenidas se combinaron y el volumen total se llevó a aforo en un balón volumétrico de 2 mL con el disolvente de extracción. La solución final fue transferida a un vial ámbar para su posterior análisis cromatográfico (**Figura 4**).

Figura 4. *Procedimiento para extracción de ANA en aceite refinado.*



Nota. Figura de autoría propia

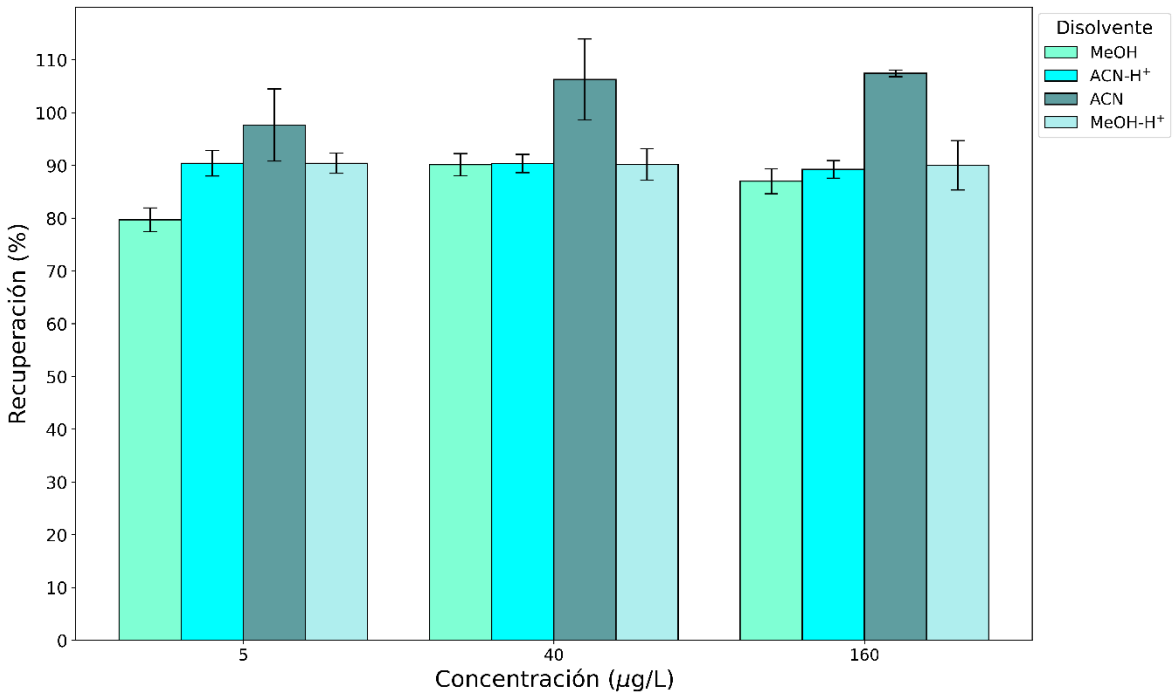
6. Resultados y discusión

1.17 Evaluación de los disolventes de extracción

La Figura 5 muestra los resultados de la evaluación de cuatro disolventes de extracción empleados para la recuperación de ANA en aceite de palma refinado: acetonitrilo

(ACN), metanol (MeOH), acetonitrilo acidificado (ACN-H^+) y metanol acidificado (MeOH-H^+). Los valores experimentales correspondientes se presentan en el **Apéndice A**.

Figura 5. *Recuperación de ANA en los diferentes disolventes de extracción.*



Nota. Figura de autoría propia

Los resultados obtenidos evidenciaron que el ACN presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), de acuerdo con el ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Este sistema de extracción mostró porcentajes de recuperación de ANA entre 97,6 y 107,4 % en los tres niveles de concentración evaluados, confirmando su alta eficiencia extractiva. Sin embargo, también presentó una mayor dispersión de los resultados, reflejada en coeficientes de variación entre 0,58 y 7,22 %. En consecuencia, aunque el uso de ACN favorece una recuperación adecuada del analito, la

variabilidad observada representa una limitación en términos de precisión y reproducibilidad del método.

En contraste, la acidificación de los disolventes orgánicos permitió obtener un comportamiento homogéneo en la extracción. El ACN-H^+ y MeOH-H^+ presentaron porcentajes de recuperación superiores al 85 %, con rangos de 89,3–90,4 % y 90,0–90,4 %, respectivamente. Así mismo, los valores de % C. V fueron de 1,86–2,68 % para ACN-H^+ y de 2,11–5,21 % para MeOH-H^+, evidenciando una menor dispersión de los resultados respecto al ACN sin acidificar. Este comportamiento puede asociarse con las propiedades ácido-base del ANA, cuyo pKa se encuentra alrededor de 4,2–4,3 debido a que, en condiciones acidificadas, se favorece la presencia de la especie protonada en la fase orgánica lo que contribuye a una respuesta analítica más reproducible.

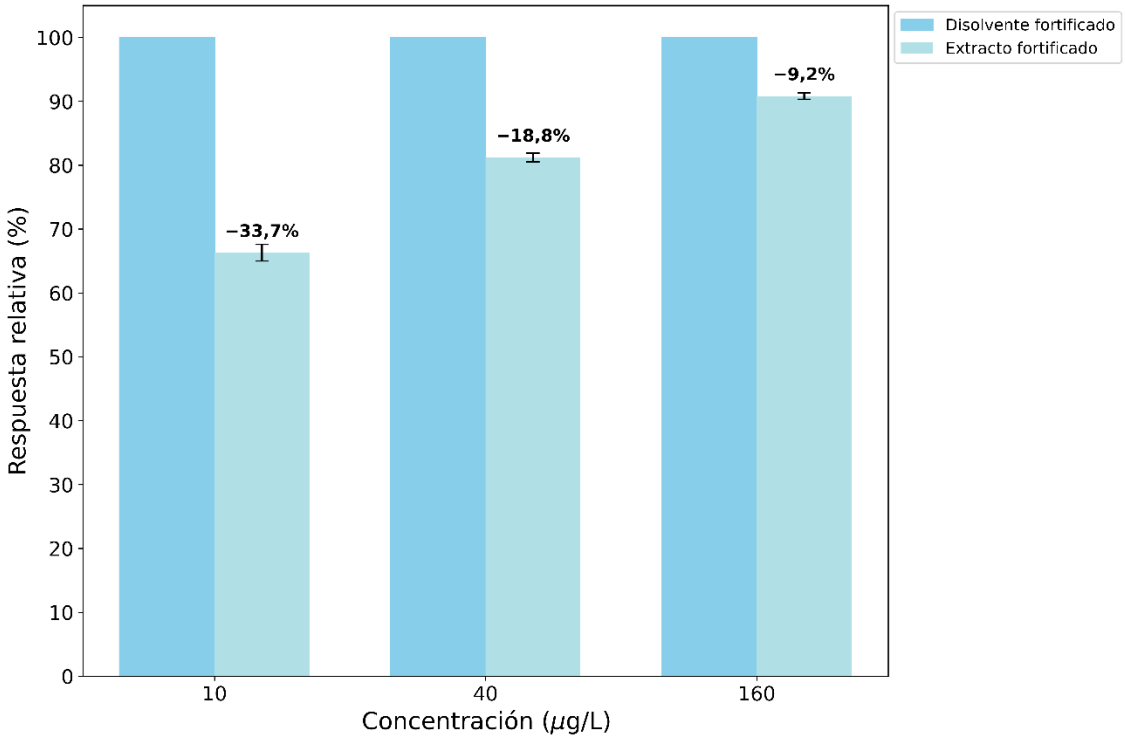
Aunque ambos sistemas acidificados presentaron porcentajes de recuperación comparables, el sistema ACN-H^+ mostró una menor variabilidad experimental, evidenciada por valores inferiores de coeficiente de variación. En consecuencia, este disolvente fue seleccionado para las etapas posteriores de desarrollo y validación del método, al proporcionar un equilibrio adecuado entre eficiencia de recuperación y precisión analítica. Adicionalmente, la evaluación de la linealidad mediante curvas de calibración reveló diferencias importantes entre ambos sistemas. El ACN presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,978, indicando una menor capacidad para describir linealmente la respuesta analítica en el rango evaluado. Por el contrario, el sistema ACN-H^+ alcanzó un R^2 de 0,999, confirmando una excelente linealidad. Estos resultados demuestran que, aunque el ACN favorece una mayor recuperación del analito, también presenta una mayor variabilidad y un desempeño inferior en términos de precisión y linealidad. Por tanto, la acidificación del

disolvente permitió mejorar la robustez del método, garantizando resultados más consistentes y confiables para la cuantificación de ANA en aceite de palma refinado.

1.18 Efecto matriz

Para evaluar el posible efecto matriz en la determinación de ANA, se emplearon como blancos de matriz muestras de aceite de palma refinado provenientes del cultivar *E. guineensis*, en las cuales no se utiliza esta auxina durante el proceso de polinización. Por esta razón, se consideraron matrices libres del analito, pero con una composición química similar a la de las muestras objeto de estudio. Estas muestras fueron sometidas al procedimiento de extracción desarrollado en el presente trabajo (Figura 4) y los extractos obtenidos se fortificaron posteriormente en tres niveles de concentración: bajo (10 µg/L), medio (40 µg/L) y alto (160 µg/L). La respuesta analítica de los extractos fortificados se comparó con la obtenida para soluciones preparadas en disolvente (ACN-H^+) a las mismas concentraciones (**Apéndice B**). La Figura 6 presenta la comparación de las respuestas relativas obtenidas en ambos sistemas, permitiendo evidenciar la influencia de la matriz sobre la señal analítica. El efecto matriz se calculó mediante la Ecuación 9.

Figura 6. *Gráfica de la supresión de la señal analítica, debido al efecto de la matriz de estudio.*



Nota. Figura de autoría propia

En los tres niveles de concentración evaluados se evidenció un efecto de supresión de la señal analítica. Sin embargo, la magnitud de este efecto no fue constante a lo largo del rango de trabajo, lo que indica que la influencia de la matriz sobre la respuesta instrumental depende de la concentración del analito. Este comportamiento sugiere que compuestos coextraídos de la matriz oleosa interfieren de manera diferencial con la detección de ANA, provocando una disminución de la señal analítica y afectando potencialmente la exactitud de la cuantificación.

Este fenómeno ha sido reportado previamente en diferentes matrices vegetales. Fan et al. (2011) observaron efectos de matriz asociados a la supresión de ionización de ANA en tejidos de colza (raíces, flores, semillas, hojas, tallos y vainas inmaduras) analizados

mediante LC-ESI-MS/MS, registrando valores de efecto matriz entre 71 y 87 %, lo que correspondió a reducciones de hasta el 29 % en la señal analítica. Los autores concluyeron que la magnitud de este efecto depende tanto de las propiedades fisicoquímicas del analito como de la complejidad y composición de la matriz analizada.

En contraste, Liu et al. (2015) reportaron valores de efecto matriz entre 98,5 y 102,6 % en aceite de soya y entre 100,4 y 102,2 % en aceite de girasol mediante HPLC-FLD/Trap-SL-MS/MS. Estos resultados evidenciaron una interferencia mínima de los compuestos coexistentes, demostrando una elevada selectividad del método para la determinación de ANA en matrices oleosas.

La comparación de estos antecedentes con los resultados obtenidos en el presente estudio confirma que la presencia de compuestos coextraídos puede generar fenómenos de supresión o realce de la señal analítica durante la determinación de ANA. Con el fin de minimizar estos efectos, Liu et al. (2015) incorporaron una etapa de derivatización utilizando 2-(12,13-dihidro-7H-dibenzo[a,g]carbazol-7-il)etil 4-metilbencenosulfonato, estrategia que incrementó la selectividad de la detección fluorescente. En ausencia de tratamientos de este tipo, la detección por fluorescencia puede verse afectada por la presencia de compuestos con propiedades fluorescentes similares a las del analito, ocasionando errores por subestimación o sobreestimación de su concentración.

En el presente trabajo, el efecto matriz identificado fue considerado durante la validación del método mediante la construcción de curvas de calibración en matriz y la realización de ensayos de recuperación en blancos de matriz fortificados. Esta estrategia, ampliamente utilizada para compensar la influencia de componentes coextraídos, ha sido aplicada por Schiano et al. (2024) e Iosif y Konstantinou (2023) en la determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva, así como por Lozano et al. (2012) para la

cuantificación de ANA en matrices vegetales. La implementación de este enfoque permitió corregir la respuesta analítica afectada por la matriz y garantizar una cuantificación más exacta y confiable del analito en aceite de palma refinado.

1.19 Rango lineal y de trabajo

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de cinco curvas de calibración preparadas en matriz (**Tabla 4**), evaluadas en un intervalo de concentraciones entre 5 y 200 µg/L (**figura 6**). La evaluación del rango de trabajo se realizó considerando los criterios de precisión, expresada como coeficiente de variación, calculado mediante la ecuación 6, y la exactitud, expresada como porcentaje de error relativo % ER calculado mediante la ecuación 8.

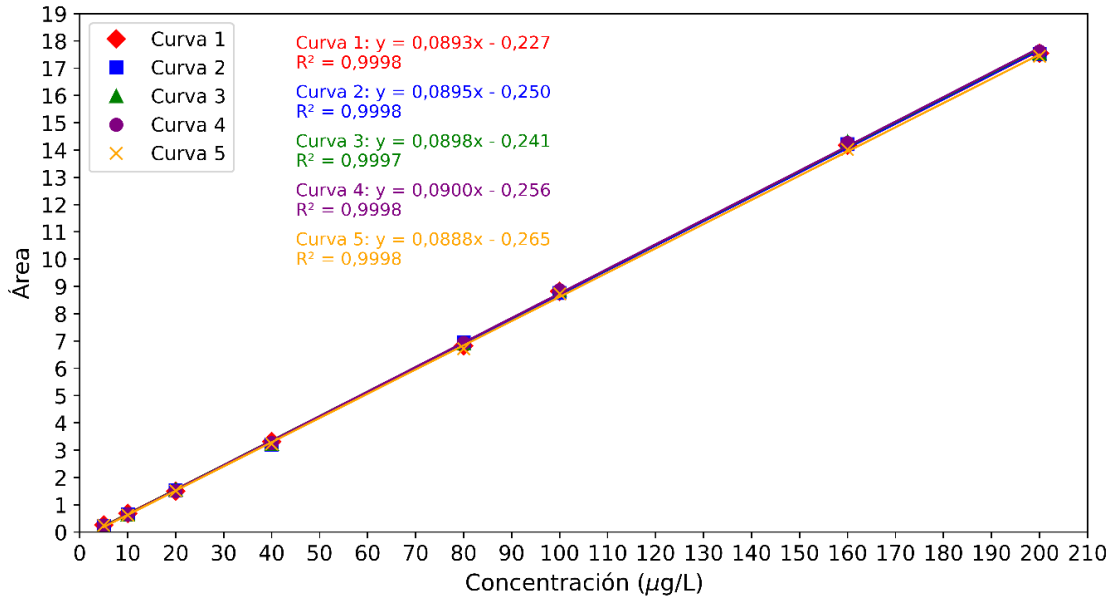
Tabla 4. *Datos obtenidos para las curvas de calibrado preparadas en días distintos.*

Concentración [µg/L]	Curva 1 área (u.a)	Curva 2 área (u.a)	Curva 3 área (u.a)	Curva 4 área (u.a)	Curva 5 área (u.a)	Área (u.a) promedio	% C. V	SD	Concentración promedio [µg/L]	Error %
2	0,111	0,090	0,083	0,080	0,078	0,088	15,19	0,013	3,759	87,93
5	0,258	0,226	0,238	0,233	0,240	0,239	4,99	0,012	5,441	8,83
10	0,679	0,648	0,642	0,615	0,646	0,646	3,52	0,023	9,989	0,11
20	1,501	1,523	1,540	1,495	1,509	1,514	1,20	0,018	19,683	1,59
40	3,320	3,206	3,236	3,262	3,224	3,250	1,36	0,044	39,079	2,3
80	6,822	6,949	6,920	6,924	6,714	6,866	1,42	0,098	79,484	0,65
100	8,825	8,759	8,855	8,855	8,732	8,805	0,64	0,057	101,153	1,15
160	14,171	14,214	14,298	14,258	14,024	14,193	0,75	0,106	161,352	0,84
200	17,541	17,513	17,540	17,613	17,432	17,528	0,37	0,065	198,612	0,69

Del análisis de los datos se observó que el nivel de concentración de 2 µg/L presentó un % C.V superior al 15 % y un porcentaje de error relativo (% ER) cercano al 88 %, evidenciando una elevada variabilidad y una desviación significativa respecto al valor teórico. Estos resultados indican que, a dicha concentración, el método no proporciona una

cuantificación confiable del analito. En consecuencia, y de acuerdo con los criterios establecidos para la determinación de los límites analíticos, este nivel se definió como límite de detección (LOD), al permitir únicamente la identificación de la presencia del analito sin garantizar su cuantificación precisa. Por el contrario, la concentración de 5 µg/L presentó valores de precisión (% C.V ≤ 15 %) y exactitud (% ER < 10 %) dentro de los criterios de aceptación establecidos, demostrando un desempeño analítico adecuado. Por esta razón, dicho nivel fue definido como límite de cuantificación (LOQ), al representar la menor concentración de ANA que puede determinarse de manera confiable con niveles aceptables de precisión y exactitud (**Tabla 4**).

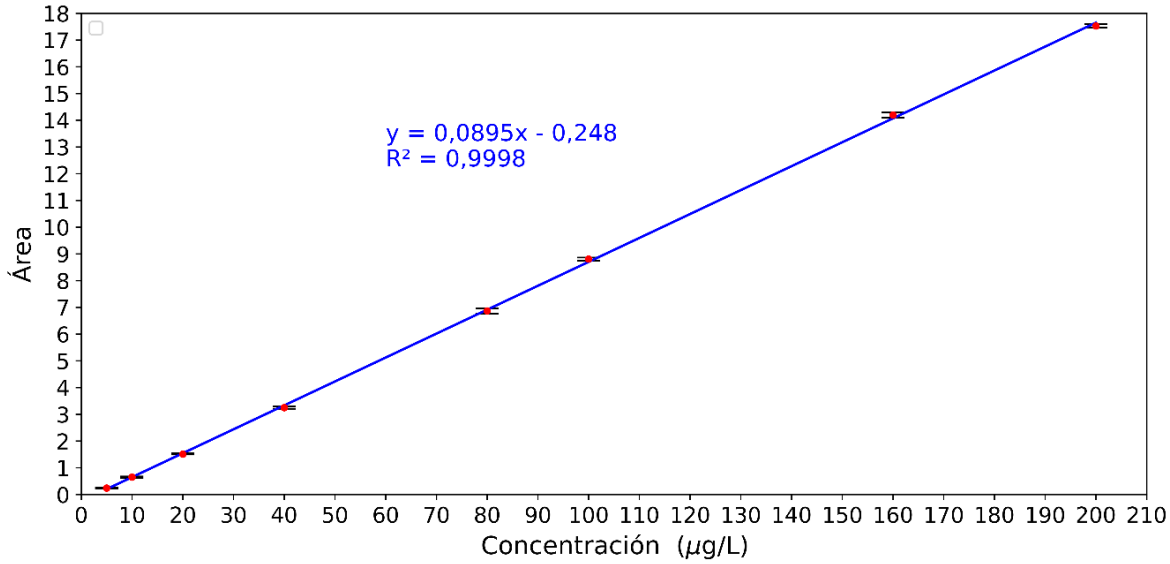
Figura 7. *Curva de calibración en cinco días distintos.*



Nota. Figura de autoría propia

Con base en estos resultados, el rango de trabajo del método se estableció entre 5 y 200 µg/L (**Figura 7**), intervalo en el que se demostró un comportamiento lineal adecuado de la respuesta analítica. La regresión lineal obtenida correspondió a la ecuación $y = 0{,}0895x - 0{,}248$, con un coeficiente de correlación (r) de 0,9999, lo que evidencia una fuerte asociación lineal entre la concentración de ANA y la respuesta cromatográfica. Asimismo, el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0,9998 (**Figura 8**), indicando que el 99,98 % de la variabilidad observada en la señal analítica es explicada por el modelo de regresión. Estos resultados demuestran un excelente ajuste de los datos experimentales al modelo lineal y confirman la capacidad del método para cuantificar ANA de manera confiable dentro del intervalo evaluado.

Figura 8. *Curva de trabajo.*

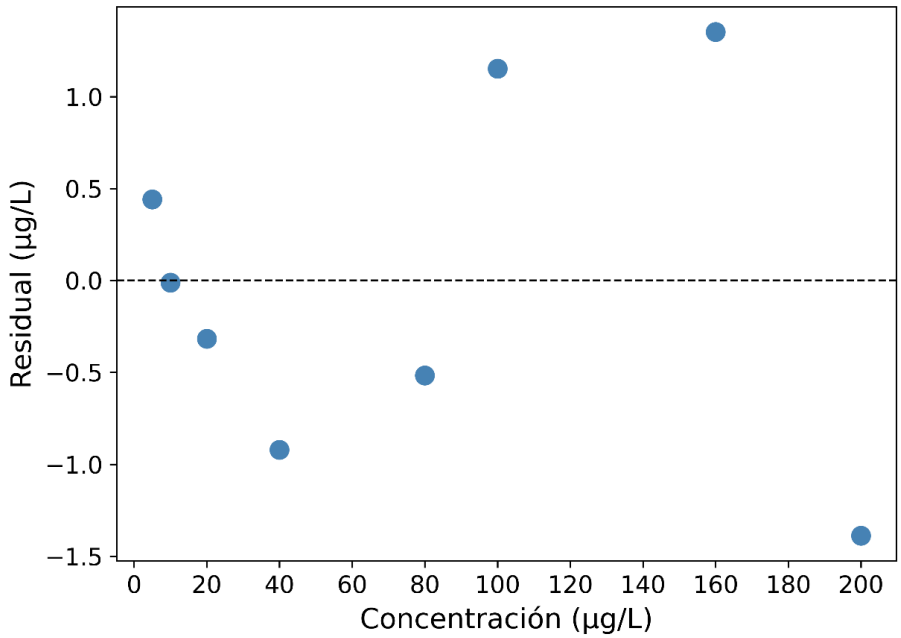


Nota. Figura de autoría propia

Lo anterior es respaldado por el análisis de los residuales el cual demostró una distribución aleatoria alrededor del valor cero en el intervalo de 5 a 200 µg/L, sin evidenciar

tendencias sistemáticas ni patrones de curvatura (**Figura 9**). La presencia de residuales positivos y negativos a lo largo del rango de trabajo indica que los errores de predicción se distribuyeron de manera homogénea, lo que respalda la adecuación del modelo lineal para describir la relación entre la concentración de ANA y la respuesta instrumental.

Figura 9. *Gráfico de los residuales para la curva de trabajo*



Nota. Figura de autoría propia

La linealidad obtenida es comparable con la reportada en estudios previos para la determinación de ANA mediante técnicas cromatográficas. Liu et al. (2015) reportaron un coeficiente de determinación de 0,9998 para concentraciones comprendidas entre 30 y 1500 ng/mL, mientras que Fan et al. (2011) obtuvieron un valor R^2 de 0,9999. Aunque los intervalos de trabajo, las matrices y las condiciones instrumentales difieren entre los estudios, los resultados muestran que la respuesta cromatográfica del ANA puede presentar un comportamiento lineal en diferentes sistemas analíticos.

La ecuación de la recta obtenida en la curva de trabajo se empleará para la cuantificación de ANA tanto en el proceso de validación del método como en el análisis de las muestras reales.

1.20 Precisión, exactitud y recuperación

Para la evaluación de la precisión, exactitud y porcentaje de recuperación del método, se emplearon blancos de matriz fortificados en tres niveles de concentración (10, 40 y 160 µg/L). Para cada nivel se analizaron diez réplicas independientes (n = 10) siguiendo el procedimiento de extracción y análisis descrito en la Figura 4 para la determinación de ANA. Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 5 y 6, mientras que los datos individuales correspondientes a cada nivel de fortificación se presentan en los **Apéndices C, D y E**.

Tabla 5. *Datos obtenidos en el análisis intradía.*

Concentración (µg/L)	n	Media (µg/L)	s	% C. V	% ER	% Recuperación
10	10	10,097	0,113	1,44	0,97	101,0
40	10	40,017	0,638	1,59	0,04	100,0
160	10	161,470	1,075	0,67	0,92	100,9

Tabla 6. *Datos obtenidos en el análisis interdía.*

Concentración (µg/L)	n	Media (µg/L)	s	% C. V	% ER	% Recuperación
10	30	10,058	0,113	1,12	0,58	100,6
40	30	39,682	0,643	1,62	-0,80	99,2
160	30	161,123	1,263	0,78	0,70	100,7

1.20.1 Precisión

La precisión del método se evaluó mediante estudios de repetibilidad (intradía) y precisión intermedia (interdía), utilizando tres niveles de concentración representativos del

rango de trabajo. Los coeficientes de variación obtenidos en el estudio intradía oscilaron entre 0,67 y 1,59 % (**Tabla 5**), mientras que los correspondientes a la evaluación interdía se encontraron entre 0,78 y 1,62 % (**Tabla 6**). En todos los casos, los valores fueron significativamente inferiores al criterio de aceptación establecido (% C.V ≤ 15 %), evidenciando una adecuada precisión del método en las condiciones evaluadas.

La similitud entre los coeficientes de variación obtenidos en los estudios intradía e interdía indica que la variabilidad adicional derivada de la ejecución del procedimiento en diferentes jornadas analíticas fue mínima. Esto sugiere que factores asociados a la preparación de muestras, las condiciones ambientales y el desempeño instrumental no ejercieron una influencia significativa sobre la dispersión de los resultados, demostrando la estabilidad y consistencia del método durante su aplicación.

Resultados similares han sido reportados en la literatura para la determinación de ANA mediante técnicas cromatográficas. Liu et al. (2015) obtuvieron coeficientes de variación intradía entre 2,07 y 4,48 % e interdía entre 4,74 y 6,60 %, concluyendo que la estrategia de extracción y derivatización desarrollada contribuyó a mejorar el desempeño analítico y a mantener una variabilidad reducida durante las mediciones. De manera análoga, Fan et al. (2011) reportaron coeficientes de variación de 0,69 % para el tiempo de retención y de 2,21 % de 2,21 % para la respuesta cromatográfica del analito, expresada como el área integrada de la señal de ANA, evidenciando una adecuada reproducibilidad del método para su determinación en tejidos de colza.

Comparativamente, los coeficientes de variación obtenidos en el presente estudio fueron iguales o inferiores a los reportados por estos autores, lo que demuestra un desempeño analítico competitivo para la determinación de ANA en aceite de palma refinado. En consecuencia, los resultados de precisión obtenidos confirman que el método genera

mediciones consistentes y reproducibles tanto bajo condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia, respaldando su idoneidad para aplicaciones rutinarias de cuantificación del analito.

1.20.2 Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante el porcentaje de error relativo (% ER), cuyos resultados se presentan en las **Tablas 5 y 6**. En la evaluación intradía, los valores de % ER oscilaron entre 0,04 y 0,97 %, mientras que en el estudio interdía se encontraron entre −0,80 y 0,70 %. En todos los casos, los valores absolutos de % ER se encontraron por debajo del criterio de aceptación establecido de ±15 %, indicando una baja desviación relativa entre las concentraciones determinadas experimentalmente y los valores nominales. Asimismo, no se observó una tendencia definida hacia la sobreestimación o subestimación del analito con el incremento de la concentración.

En la literatura, Liu et al. (2015) reportó valores de error relativo entre −2,96 y 1,20 % en condiciones intradía y entre −4,30 y −3,30 % en condiciones interdía, para la cuantificación de ANA. Por otra parte, Fan et al. (2011) expresaron la exactitud como el porcentaje de la concentración nominal determinada experimentalmente, con valores comprendidos entre 67,4 y 86,4 % para los diferentes tejidos de colza evaluados. Considerando que el 100 % corresponde a la concentración nominal, estos valores equivalen a errores relativos entre −32,6 y −13,6 %, respectivamente.

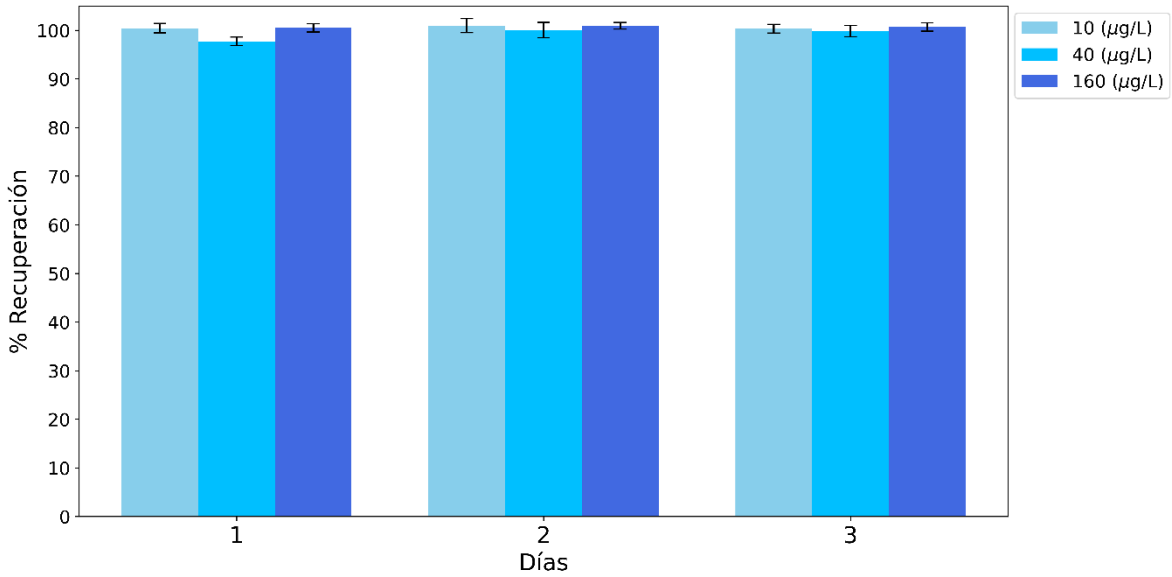
En comparación con los antecedentes reportados, los valores de error relativo (%ER) obtenidos en el presente estudio fueron de menor magnitud, registrándose valores absolutos inferiores al 1 % tanto en condiciones de repetibilidad (intradía) como de precisión intermedia (interdía). Estos resultados evidencian una mínima diferencia sistemática entre las concentraciones experimentales determinadas y sus respectivos valores nominales,

demostrando una elevada concordancia entre el valor medido y el valor de referencia. En consecuencia, el método presentó un alto grado de exactitud dentro del rango de concentraciones evaluado, garantizando la confiabilidad de los resultados obtenidos para la determinación de ANA.

1.20.3 Porcentaje de recuperación

Los porcentajes de recuperación obtenidos para el ANA se encontraron entre 100,0 y 101,0 % en la evaluación intradía y 99,2 y 100,7 % en la evaluación interdía (**figura 10**). La proximidad de estos valores al 100 % indica que, bajo las condiciones experimentales empleadas, el procedimiento permitió recuperar cuantitativamente el analito a partir de la matriz de aceite refinado. Evidenciando la alta eficiencia del método para la extracción del ANA.

Figura 10. *Recuperación de ANA en días distintos.*



Nota. Figura de autoría propia

Los resultados obtenidos son comparables con los reportados para la determinación de ANA en matrices oleosas. Liu et al. (2015) reportaron recuperaciones entre 96,1 y 104,4 % para ANA en aceites vegetales (soya y girasol). En dicho estudio, los valores fueron asociados con un desempeño adecuado del procedimiento de extracción (extracción asistida por microondas combinada con derivatización) y su bajo efecto matriz.

De manera similar, Fan et al. (2011) reportaron recuperaciones entre 88,1 y 99,8 % para ANA en los diferentes tejidos de colza, observándose diferencias en función de la matriz analizada. Los autores relacionaron parte de esta variabilidad con la influencia de los componentes de la matriz sobre la respuesta instrumental.

En la presente validación, la aplicación de una extracción líquido-líquido empleando ACN-H^+, combinada con una estrategia de calibración en matriz, permitió obtener porcentajes de recuperación cercanos al 100 % y coeficientes de variación inferiores al 2 %. Estos resultados evidencian que el procedimiento de preparación de muestra minimiza las pérdidas del analito durante la etapa de extracción y que la calibración en matriz compensa de manera efectiva la influencia de los componentes coextraídos sobre la respuesta instrumental. En conjunto, ambas estrategias contribuyeron a mejorar la exactitud y precisión del método, proporcionando una respuesta analítica estable, reproducible y confiable para la determinación de ANA en aceite de palma refinado bajo las condiciones evaluadas.

1.21 Incertidumbre

La incertidumbre del método se evaluó en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), considerando la contribución de la repetibilidad y la precisión intermedia. En la **Tabla 7** se presentan los valores promedio y desviación media para cada concentración y día, calculados mediante las ecuaciones 4 y 5, respectivamente. A partir de estos datos, se estimó la desviación estándar de repetibilidad (Sn) mediante la ecuación 11 y la desviación estándar

asociada a la precisión intermedia (SIP) mediante la ecuación 12. Posteriormente, la desviación estándar total del método (St,n) se obtuvo con la ecuación 13, integrando ambas fuentes de variabilidad. La incertidumbre estándar del promedio (u) se calculó mediante la ecuación 14, considerando n = 10 réplicas por día. En la **Tabla 8** se presentan los valores de Sn, SIP, St,n, la incertidumbre estándar, la incertidumbre expandida y la incertidumbre relativa, calculados mediante las ecuaciones 11 a 16. Los resultados mostraron que el nivel de 40 µg/L presentó la mayor incertidumbre relativa (1,14 %), correspondiente a una incertidumbre expandida de ± 0,453 µg/L. Por esta razón, este valor se adoptó para la expresión de la incertidumbre en muestras reales a lo largo del intervalo de medición.

Tabla 7. *Datos obtenidos para los análisis diarios.*

Concentración (µg/L)	Promedio			Desviación estándar		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
10	10,046	10,097	10,032	0,096	0,145	0,090
40	39,093	40,017	39,936	0,353	0,638	0,469
160	160,822	161,470	161,077	1,362	1,075	1,375

Tabla 8. *Incertidumbres estimadas durante la validación.*

Concentración (µg/L)	S_n	S_{IP}	$S_{t,n}$	u	U	U %
10	0,113	0,034	0,118	0,037	0,075	0,74
40	0,501	0,512	0,716	0,226	0,453	1,14
160	1,278	0,326	1,319	0,417	0,834	0,52

7. Aplicación del método

La metodología validada se aplicó al análisis de 50 muestras de aceite de palma refinado (**Apéndice F**) provenientes de una planta refinadora de la zona oriental. Las respuestas instrumentales obtenidas para cada muestra fueron transformadas a concentración mediante la ecuación de calibración establecida durante la validación del método. Los valores estimados oscilaron entre 0,0059 y 0,0075 mg/kg; sin embargo, dichas concentraciones se

encontraron por debajo del límite de cuantificación (LOQ) del método (5 µg/L). En consecuencia, estos resultados no pueden considerarse cuantificables con la exactitud y precisión requeridas para su reporte analítico. No obstante, se presentan con fines de caracterización de la respuesta analítica observada en la matriz de aceite refinado y para evaluar el comportamiento del método frente a niveles traza del analito. Los valores reportados corresponden a estimaciones obtenidas mediante extrapolación de la curva de calibración y deben interpretarse únicamente como indicativos de la posible presencia de ANA en concentraciones inferiores al intervalo cuantificable del método (**Tabla 9**).

Tabla 9. *Muestras aceite refinado analizadas.*

Código	Peso (g)	Área	Concentración (µg/L) y = 0,0895x - 0,248	mg/kg ANA	% C. V
25P021-G1-001	1,0252	0,057	3,408	0,0066	
25P021-G1-002	1,0118	0,057	3,408	0,0067	
25P021-G1-003	1,0045	0,064	3,486	0,0069	
25P021-G1-004	1,0014	0,056	3,397	0,0068	
25P021-G1-005	1,0045	0,038	3,196	0,0063	
25P021-G1-006	1,0213	0,072	3,575	0,0070	
25P021-G1-007	1,0032	0,050	3,330	0,0066	
25P021-G1-008	1,0239	0,074	3,598	0,0070	
25P021-G1-009	1,0150	0,062	3,464	0,0068	
25P021-G1-010 (1)	1,0141	0,048	3,307	0,0065	
25P021-G1-010 (2)	1,0161	0,056	3,397	0,0067	1,32
25P021-G1-010 (3)	1,0168	0,055	3,385	0,0067	

Los coeficientes de variación asociados a las determinaciones fueron inferiores al 5 %, lo que evidencia una baja dispersión relativa entre las réplicas analizadas. No obstante, es importante considerar que las concentraciones estimadas se encontraron por debajo del límite de cuantificación (LOQ) del método; por esta razón, aunque la variabilidad observada fue reducida, la incertidumbre relativa asociada a los resultados es mayor, lo que se refleja en un incremento del error de cuantificación a estos niveles de concentración.

Las concentraciones estimadas de ANA en las muestras de aceite de palma refinado se encontraron por debajo de los límites máximos de residuos (LMR) establecidos internacionalmente para fruto de palma, los cuales corresponden a 0,06 mg/kg según la EFSA y 0,10 mg/kg según la EPA. Aunque actualmente las regulaciones vigentes contemplan únicamente el fruto de palma como matriz de referencia, la evaluación del aceite refinado resulta de interés debido a que constituye un producto destinado al consumo humano y puede representar una posible vía de exposición a residuos de esta auxina, utilizada durante el proceso de polinización asistida del cultivo. Los resultados obtenidos evidenciaron que los niveles de ANA presentes en el aceite refinado fueron inferiores a los límites establecidos para la materia prima, lo que sugiere una baja transferencia del compuesto hacia el producto final o una reducción de su concentración durante las etapas de procesamiento y refinación del aceite. No obstante, se requieren estudios complementarios para establecer límites específicos y criterios regulatorios aplicables a esta matriz.

8. Conclusiones

- Se desarrolló una metodología confiable para la determinación de ácido 1-naftalenacético (ANA) en aceite de palma refinado mediante extracción líquido-líquido con acetonitrilo acidificado, la cual presentó recuperaciones entre 89,3 y 90,4 % en los niveles evaluados. Estos resultados confirmaron la adecuada exactitud del método y su aplicabilidad para el monitoreo de residuos de ANA en aceite de palma refinado.
- Se estandarizó satisfactoriamente una metodología para la determinación de ácido 1-naftalenacético (ANA) mediante HPLC-FLD en aceite de palma refinado. La

aplicación de calibración en blanco de matriz permitió compensar el efecto matriz observado y asegurar una respuesta analítica proporcional a la concentración del analito en el rango de 5 a 200 µg/L, demostrando la idoneidad del método para su cuantificación en aceite de palma refinado.

- Se realizó la validación de la metodología propuesta permitiendo establecer una metodología confiable y robusta para la cuantificación de ANA en aceites refinados de palma, al cumplir con los criterios de aceptación para los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, recuperación, límite de detección y límite de cuantificación, garantizando la confiabilidad de los resultados obtenidos.
- Se determinó la concentración de ANA en 50 muestras de aceite de palma refinado provenientes del cultivar híbrido interespecífico OxG. Los resultados evidenciaron concentraciones inferiores a 0,007 mg/kg, indicando una presencia residual muy baja del compuesto en esta matriz. Aunque actualmente no existen límites máximos de residuos específicos para ANA en aceite de palma refinado, los valores obtenidos se encontraron por debajo de los límites establecidos internacionalmente para fruto de palma (0,06 mg/kg según la EFSA y 0,10 mg/kg según la EPA). Estos resultados sugieren que el aceite refinado cumple con los criterios de seguridad establecidos para la materia prima y evidencian un bajo riesgo asociado a la presencia de residuos de ANA en el producto destinado al consumo humano.

Referencias bibliográficas

Ahumada, D., Paredes, C., Abella, J., & González, I. (2023). *Validación de métodos en análisis químico cuantitativo* (Vol. 1). https://hub.unido.org/sites/default/files/publications/Validacion-de-metodos-en-analisis-quimico-cuantitativo_compressed.pdf

Alegría Lagos, M., Vélez Fernández, D., Varón, F., Martínez López, G., Torres Londoño, G., & Corredor Mejía, J. (2015). Comportamiento frente a la pudrición del cogollo (PC) de palmas derivadas de cruzamientos entre palmas *Elaeis guineensis* sobrevivientes a la epidemia en Tumaco, Nariño. *Palmas, 36*(2), 69–77. https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/11078

Amorós, A., Zapata, P., Pretel, M. T., Botella, M. A., Almansa, M. S., & Serrano, M. (2004). Role of naphthalene acetic acid and phenothiol treatments on increasing fruit size and advancing fruit maturity in loquat. *Scientia Horticulturae, 101*(4), 387–398. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.11.010

An, L., Ma, J., Qin, D., Wang, H., Yuan, Y., Li, H., Na, R., & Wu, X. (2019). Novel strategy to decipher the regulatory mechanism of 1-naphthaleneacetic acid in strawberry maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67*(4), 1292–1301. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05233

Ashburner, G. R., Thompson, W. K., & Burch, J. M. (1993). Effect of α-naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 35*(2), 157–163. https://doi.org/10.1007/BF00032965

Bastidas Pérez, S., Peña Rojas, E. A., & Reyes Cuesta, R. (2003). Genealogía del germoplasma de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) del proyecto de mejoramiento genético de Corpoica. *Palmas, 24*(1), 21–29. https://repositorio.fedepalma.org/handle/123456789/144052

Batista-Silva, W., de Paiva Gonçalves, J., Siqueira, J. A., Martins, A. O., Ribeiro, D. M., Nunes-Nesi, A., Zsögön, A., & Araújo, W. L. (2024). Auxin metabolism and the modulation of plant growth. *Environmental and Experimental Botany, 226*, 105917. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2024.105917

Bello C., L. L., García P., A. M., Peña M., J. del C., Pabón V., J. G., & Díaz R., Ó. M. (2022). Implementación de las mejores prácticas de manejo de los cultivares híbrido OxG en la palmicultura a pequeña escala. *Palmas, 43*(1), 130–140. https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/13758

Bisht, N., Gupta, A., Awasthi, P., Goel, A., Chandran, D., Sharma, N., & Singh, N. (2021). Development of a rapid LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of various flavonoids, isoflavonoids, and phytohormones extracted from *Medicago truncatula* leaves. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 44*(15–16), 776–787. https://doi.org/10.1080/10826076.2022.2040028

Bravo, V., Solórzano, O., Calixto, B., & Bastidas, J. (2022). Aplicación de polen y ácido α-naftalenacético en híbrido OxG en Ecuador. ¿Polinizar sin mezclarlos genera beneficios? *Palmas, 43*(1), 10–20. https://doi.org/10.56866/01212923.13736

Cantwell, H. (Ed.). (2025). *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics* (3rd ed.). Eurachem. https://www.eurachem.org

Corley, R. H. V., & Tinker, P. B. (2015). *The oil palm* (5th ed.). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781118953297

Dal Santo, S., Tucker, M. R., Tan, H. T., Burbidge, C. A., Fasoli, M., Böttcher, C., Boss, P. K., Pezzotti, M., & Davies, C. (2020). Auxin treatment of grapevine (*Vitis vinifera* L.) berries delays ripening onset by inhibiting cell expansion. *Plant Molecular Biology*, *103*(1–2), 91–111. https://doi.org/10.1007/s11103-020-00977-1

Daza, E., Ayala-Díaz, I., Ruiz-Romero, R., & Romero, H. M. (2021). Effect of the application of plant hormones on the formation of parthenocarpic fruits and oil production in oil palm interspecific hybrids (*Elaeis oleifera* Cortés × *Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Production Science, 24*(3), 354–362. https://doi.org/10.1080/1343943X.2020.1862681

Dixon, P. A. F., Caldwell, J., & Smith, R. L. (1977a). Metabolism of arylacetic acids: 1. The fate of 1-naphthylacetic acid and its variation with species and dose. *Xenobiotica, 7*(11), 695–706. https://doi.org/10.3109/00498257709038699

Dixon, P. A. F., Caldwell, J., & Smith, R. L. (1977b). Metabolism of arylacetic acids: 4. Physico-chemical, structural and biological factors influencing the pattern of conjugation. *Xenobiotica, 7*(12), 727–736. https://doi.org/10.3109/00498257709038702

Elkins, L. J., & Spiegelman, M. (2021). pyUserCalc: Una calculadora revisada de cuaderno Jupyter para desequilibrios en series de uranio en basaltos. *Earth and Space Science, 8*, e2020EA001619. https://doi.org/10.1029/2020EA001619

Esparza, X., Moyano, E., Cosialls, J. R., & Galceran, M. T. (2013). Determination of naphthalene-derived compounds in apples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta, 782*, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.067

European Commission. (2016). Commission Regulation (EU) 2016/1015 of 17 June 2016 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 1-naphthylacetamide, 1-naphthylacetic acid, chloridazon, fluazifop-P, fuberdiazole, mepiquat and tralkoxydim in or on certain products (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union, L 172*, 1–21.

Fan, S., Wang, X., Li, P., Zhang, Q., & Zhang, W. (2011). Simultaneous determination of 13 phytohormones in oilseed rape tissues by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the evaluation of the matrix effect. *Journal of Separation Science*, *34*(6), 640–650. https://doi.org/10.1002/jssc.201000541

Food Safety Authority. (2014). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for indolylbutyric acid according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal, 12*(7), 1–52. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3748

García, A., Ibagué, D., Munévar, D. E., Hernández, J. S., & Mosquera-Montoya, M. (2020). Polinización artificial: ¿ANA en suspensión líquida o ANA en mezcla sólida? *Palmas, 41*(4), 15–26.

Genty, P., & Ujueta López, M. R. (2013). *Relatos sobre el híbrido interespecífico de palma de aceite OxG-Coari × La Mé: Esperanza para el trópico*. Fedepalma.

Guan, W., Xu, P., Wang, K., Song, Y., & Zhang, H. (2011). Determination and study on dissipation of 1-naphthylacetic acid in garlic and soil using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology, 49*(11), 2869–2874. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.009

Iosif, K., & Konstantinou, I. (2023). Determination of pesticide residues in olive oil using QuEChERS extraction and liquid chromatography–Orbitrap high-resolution mass spectrometry: Comparison of different clean-up sorbents and validation study. Sustainability, 15(11), 8714. https://doi.org/10.3390/su15118714

Janíková, L., Chýlková, J., Šelešovská, R., Sedlák, M., Váňa, J., Dušek, L., & Bartáček, J. (2020). Electrochemical behavior of plant growth stimulator 1-naphthaleneacetic acid and its voltammetric determination using boron doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry, 859*, 113855. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.113855

Li, L., Chen, J., Li, Y., Song, N., Zhu, L., & Li, Z. (2020). Synthesis of fluorescent pink emitting copper nanoparticles and sensitive detection of α-naphthaleneacetic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 224*, 117433. https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117433

Li, Z. Y., Zhu, J. H., Xu, Y. Z., Zhao, J., Liu, Y. S., Wang, L. L., Sun, S. Y., & Ji, S. L. (2024). Facile preparation of covalent-organic framework composites for magnetic solid-phase extraction of naphthaleneacetic acid in food prior to HPLC-UV analysis. *Journal of Chromatography A, 1731*, 465180. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465180

Liang, S. Z., Pan, J. R., Yin, X. M., & Sui, K. (2015). The development of an electrochemical immunosensor for 1-naphthylacetic acid. *Research Journal of Biotechnology, 10*(8), 1–5.

Linares, O., Santacruz, L., & Rosero, G. (2019). Evaluación de la polinización artificial en el material híbrido OxG (*Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*). *Palmas, 40*(4), 96–105. https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/12934

Liu, M., Chen, G., Guo, H., Fan, B., Liu, J., Fu, Q., Li, X., Lu, X., Zhao, X., Li, G., Sun, Z., Xia, L., Zhu, S., Yang, D., Cao, Z., Wang, H., Suo, Y., & You, J. (2015). Accurate analysis and evaluation of acidic plant growth regulators in transgenic and nontransgenic edible oils with facile microwave-assisted extraction-derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63*(35), 8058–8067. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02489

Liu, Z., Wang, J., Guo, Y., Liu, W., Yang, X., Wu, Q., & Wang, Z. (2022). Sensitive determination of auxins in environmental water and peach beverage by hyper crosslinked polymer-based solid-phase extraction with high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 1678*, 463345. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463345

Lozano, A., Pérez-Parada, A., Heinzen, H., & Fernández-Alba, A. R. (2012). Inclusion of 1-naphthylacetic acid and 2-(1-naphthyl)acetamide into three typical multiresidue methods for LC/MS/MS analysis of tomatoes and zucchini. Journal of AOAC International, 95(5), 1520-1527. https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-509

Lu, Y.-H., Cao, Y.-M., Guo, X.-F., Wang, H., & Zhang, H.-S. (2016). Determination of gibberellins using HPLC coupled with fluorescence detection. *Analytical Methods, 8*(7), 1520–1526. https://doi.org/10.1039/C5AY03133H

Ma, L., Zhang, H., Xu, W., He, X., Yang, L., Luo, Y., & Huang, K. (2013). Simultaneous determination of 15 plant growth regulators in bean sprout and tomato with liquid chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. Food Analytical Methods, 6(3), 941–951. https://doi.org/10.1007/s12161-012-9505-4

Milić, B., Tarlanović, J., Keserović, Z., Magazin, N., Miodragović, M., & Popara, G. (2018). Bioregulators can improve fruit size, yield and plant growth of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Scientia Horticulturae, 235,* 214–220. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.004

Miller, J. C., & Miller, J. N. (1993). *Estadística para química analítica* (2.ª ed.). Addison-Wesley Iberoamericana.

Montoya, C., Mejia-Alvarado, F. S., Botero-Rozo, D., Ayala-Díaz, I. M., & Romero, H. M. (2023). Parthenocarpy-related genes induced by naphthalene acetic acid in oil palm interspecific O × G [*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés × *Elaeis guineensis* Jacq.] hybrids. *Frontiers in Genetics, 14,* Article 1099489. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1099489

Mosquera Montoya, M., Camperos Reyes, J., García Pinilla, A., Sinisterra Ortiz, K., Munévar Martínez, D., Ruiz Álvarez, E., Mesa Fuquen, E., & Hernández Rendón, D. (2021). *Tecnologías validadas a escala comercial para el manejo del híbrido interespecífico OxG* (Boletín Técnico No. 39). Cenipalma.

Murillo Pulgarín, J. A., García Bermejo, L. F., Sánchez-Ferrer Robles, I., & Becedas Rodríguez, S. (2012). Simultaneous determination of plant growth regulators 1-naphthylacetic acid and 2-naphthoxyacetic acid in fruit and vegetable samples by room temperature phosphorescence. *Phytochemical Analysis, 23*(3), 214–221. https://doi.org/10.1002/pca.1345

Nikolelis, D. P., Chaloulakos, T. I., Nikoleli, G. P., & Psaroudakis, N. (2008). A portable sensor for the rapid detection of naphthalene acetic acid in fruits and vegetables using stabilized in air lipid films with incorporated auxin-binding protein 1 receptor. *Talanta, 77*(2), 786–792. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.030

Ochoa C., I. E., & Palacio M., N. (2021). Contribución al diseño de racimos con ácido α-naftalenacético (ANA). *Palmas, 42*(1), 119–129. https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/13456

O'Donnell, P. J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J. B., & Klee, H. J. (2003). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology, 133*(3), 1181–1189. https://doi.org/10.1104/pp.103.030379

Ortolá, A. G., Monerri, C., & Guardiola, J. L. (1991). The use of naphthalene acetic acid as a fruit growth enhancer in Satsuma mandarin: A comparison with the fruit thinning effect. *Scientia Horticulturae, 47*(1–2), 15–25. https://doi.org/10.1016/0304-4238(91)90023-R

Pamplany, A., & Gordijn, B. (2023). Environmental protection. En *Handbook of the Anthropocene: Humans Between Heritage and Future* (pp. 1035–1039). Springer. https://doi.org/10.1007/9783031259104_170

Qian, C., Ren, N., Wang, J., Xu, Q., Chen, X., & Qi, X. (2018). Effects of exogenous application of CPPU, NAA and GA4+7 on parthenocarpy and fruit quality in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Food Chemistry, 243*, 410–413. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.150

Qiu, W., Chen, J., Hua, Y., Yang, Y., & Lin, S. (2024). Method development, multi-residue determination, and dietary exposure risk assessment of plant growth regulators in homologous materials of medicine and food. *Environmental Monitoring and Assessment, 196*(11), 1039. https://doi.org/10.1007/s10661-024-13204-x

Romero, H. M. (2018). Polinización artificial de híbridos OxG para la obtención de frutos partenocárpicos y la producción de aceite (Elaeis oleifera Cortés × Elaeis guineensis Jacq.). Revista Palmas, agosto de 2018, 15-18.

Romero, H. M., Daza, E., Ayala-Díaz, I., & Ruiz-Romero, R. (2021a). High-oleic palm oil (HOPO) production from parthenocarpic fruits in oil palm interspecific hybrids using naphthalene acetic acid. *Agronomy, 11*(2), Article 290. https://doi.org/10.3390/agronomy11020290

Romero, H. M., & Ayala, I. M. (2021b). Cómo alcanzar 10 toneladas de aceite por hectárea: tecnologías de manejo de los híbridos interespecíficos OxG hacia una producción altamente eficiente. *Palmas, 42*(1), 55–64.

Romero, H. M., Guataquira, S., & Forero, D. C. (2022a). Light interception, photosynthetic performance, and yield of oil palm interspecific OxG hybrid (*Elaeis oleifera* [Kunth] Cortés × *Elaeis guineensis* Jacq.) under three planting densities. *Plants, 11*(9), Article 1166. https://doi.org/10.3390/plants11091166

Romero Angulo, H. M., Daza, E., Ayala-Díaz, I., & Ruiz-Romero, R. (2022b). Producción de aceite de palma alto oleico (APAO) a partir de frutos partenocárpicos en híbridos interespecíficos de palma de aceite utilizando ácido naftalenacético. *Palmas, 43*(3), 18–39. https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/13914

Ruíz Álvarez, E., Fontanilla Díaz, C. A., Mesa Fuquen, E., Mosquera Montoya, M., Molina, D. L., & Rincón Rincón, Á. (2015). Prácticas de manejo y costos de producción de la palma de aceite híbrido OxG en plantaciones de la Zona Oriental y Suroccidental de Colombia. *Palmas, 36*(4), 11–29. https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/116

Sajjad, Y., Jaskani, M. J., Asif, M., & Qasim, M. (2017). Application of plant growth regulators in ornamental plants: A review. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 54*(2), 327–333. https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.3659

Schiano, M. E., Sodano, F., Cassiano, C., Magli, E., Seccia, S., Rimoli, M. G., & Albrizio, S. (2024). Monitoring of seven pesticide residues by LC-MS/MS in extra virgin olive oil samples and risk assessment for consumers. Food Chemistry, 442, 138498. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138498

Siddiqui, M. W., Ayala-Zavala, J. F., & Hwang, C. A. (2016). *Postharvest management approaches for maintaining quality of fresh produce*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23582-0

Sri Hari Babu, R., Srilatha, V., & Joshi, V. (2022). Plant growth regulators. En *Plant Growth Regulators in Tropical and Sub-Tropical Fruit Crops* (pp. 1–13).

Swartz, M., & Krull, I. (2012). *Handbook of analytical validation*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/b12039

Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Chemistry International, 24*(5), 26–26. https://doi.org/10.1515/ci.2002.24.5.26a

United States Environmental Protection Agency. (2007). *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Naphthaleneacetic Acid, Its Salts, Ester, and Acetamide* (Case No. 0379; EPA-HQ-OPP-2006-0507).

United States Environmental Protection Agency. (2019). *Naphthalene acetates: Draft human health risk assessment for registration review* (Decision No. 554023; EPA-HQ-OPP-2014-0773-0026).

Vargas T., E. (2002). Décadas 1960 y 1970. La palma de aceite: fincas y empresas. *Palmas, 23*(3), 86–92. https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/930

Vriezen, W. H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J., & Mariani, C. (2008). Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist, 177*(1), 60–76. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02254.x

Wang, C., Ding, C., Wu, Q., & Xiong, X. (2019). Molecularly imprinted polymers with dual template and bifunctional monomers for selective and simultaneous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of four plant growth regulators in plant-derived tissues and foods. *Food Analytical Methods*. https://doi.org/10.1007/s12161-019-01455-1

Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., Chaabouni, S., Latché, A., Pech, J. C., & Bouzayen, M. (2005). The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *The Plant Cell, 17*(10), 2676–2692. https://doi.org/10.1105/tpc.105.033415

Wang, Z. H., Xia, J. F., Han, Q., Shi, H. N., Guo, X. M., Wang, H., & Ding, M. Y. (2013). Multi-walled carbon nanotube as a solid phase extraction adsorbent for analysis of indole-3-butyric acid and 1-naphthylacetic acid in plant samples. *Chinese Chemical Letters, 24*(7), 588–592. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2013.04.015

Watanabe, E., Baba, K., & Eun, H. (2007). Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in agricultural samples by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography equipped with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(10), 3798–3804. https://doi.org/10.1021/jf063140m

Wu, X., Gong, D., Zhao, K., Chen, D., Dong, Y., Gao, Y., Wang, Q., & Hao, G. F. (2024). Research and development trends in plant growth regulators. *Advanced Agrochem, 3*(1), 99–106. https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.11.005

Xing, X., Cao, C., Li, S., Wang, H., Xu, Z., Qi, Y., Tong, F., Jiang, H., & Wang, X. (2023). α-Naphthaleneacetic acid positively regulates soybean seed germination and seedling establishment by increasing antioxidant capacity, triacylglycerol mobilization and sucrose transport under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry, 201*, 107890. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107890

Yoshikawa, F., Martin, G. C., & Larue, J. H. (1988). *Chemical growth regulator for peaches*. University of California Cooperative Extension.

Zhang, X., Niu, J., Zhang, X., Xiao, R., Lu, M., & Cai, Z. (2017). Graphene oxide-SiO_2 nanocomposite as the adsorbent for extraction and preconcentration of plant hormones for HPLC analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1046*, 58–64. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.004

Zweig, G., Gutnick, D. L., Gulli, R., Archer, T. E., & Hartmann, H. T. (1964). Fruit thinner residues: Residue determination of naphthaleneacetic acid in olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 12*(1), 59–61. https://doi.org/10.1021/jf60131a018

Apendices

Apéndice A. *Porcentaje de recuperación de ANA con distintos solventes de extracción.*

MeOH

Concentración	QC Área (u.a)	n=1 Área (u.a)	n=2 Área (u.a)	n=3 Área (u.a)	n=4 Área (u.a)	Área promedio (u.a)	% Re	% C. V
5 ppb	0,611	0,494	0,474	0,477	0,503	0,487	79,1	2,84
40 ppb	3,895	3,444	3,514	3,625	3,461	3,511	90,1	2,33
160 ppb	16,045	14,226	13,407	14,011	14,183	13,957	87,0	2,71

MeOH-H^+

Concentración	QC Área (u.a)	n=1 Área (u.a)	n=2 Área (u.a)	n=3 Área (u.a)	n=4 Área (u.a)	Área promedio (u.a)	% Re	% C. V
5 ppb	0,610	0,563	0,557	0,536	0,550	0,552	90,4	2,11
40 ppb	4,143	3,702	3,614	3,907	3,720	3,736	90,2	3,30
160 ppb	15,975	15,433	13,657	14,183	14,253	14,382	90,0	5,21

ACN

Concentración	QC Área (u.a)	n=1 Área (u.a)	n=2 Área (u.a)	n=3 Área (u.a)	n=4 Área (u.a)	Área promedio (u.a)	% Re	% C. V
5 ppb	0,521	0,547	0,505	0,462	0,521	0,509	97,6	7,01
40 ppb	3,190	3,170	3,725	3,254	3,414	3,391	106,3	7,22
160 ppb	12,552	13,46	13,387	13,55	13,549	13,487	107,4	0,58

ACN-H^+

Concentración	QC Área (u.a)	n=1 Área (u.a)	n=2 Área (u.a)	n=3 Área (u.a)	n=4 Área (u.a)	Área promedio (u.a)	% Re	% C. V
5 ppb	0,591	0,553	0,529	0,536	0,519	0,534	90,4	2,679
40 ppb	3,786	3,450	3,333	3,486	3,415	3,421	90,2	1,913
160 ppb	15,427	14,146	13,611	13,711	13,608	13,769	89,3	1,858

Apéndice B. *evaluación del efecto matriz.*

Concentración	área	% C. V	% Efecto matriz = (extracto fortificado/señal analito en solvente) *100	Criterio
QC 10 ppb	0,989	1,98	100,0	Supresión en (%)
10 ppb	0,660		66,7	33,7
	0,636		64,3	
	0,667		67,4	
	0,670		67,7	
	0,651		65,8	
	0,640		64,7	
	0,677		68,5	
	0,649		65,6	
	0,652		65,9	
	0,655		66,2	
QC 40 ppb	4,111	0,83	100,0	Supresión en (%)
40 ppb	3,33		81,0	18,8
	3,326		80,9	
	3,323		80,8	
	3,325		80,9	
	3,307		80,4	
	3,321		80,8	
	3,33		81,0	
	3,352		81,5	
	3,397		82,6	
	3,374		82,1	
QC 160 ppb	15,613	0,54	100,0	Supresión en (%)
160 ppb	14,24		91,2	9,2
	14,258		91,3	
	14,318		91,7	
	14,116		90,4	
	14,253		91,3	
	14,147		90,6	
	14,116		90,4	
	14,121		90,4	
	14,149		90,6	
	14,085		90,2	

Apéndice C. *Precisión y exactitud día 1.*

Precisión y exactitud Día 1				
Concentración	Área	Concentración y = 0,08947x - 0,248	%Re	% C.V
10 ppb	0,656	10,101	100,5	0,95
	0,665	10,201		
	0,643	9,955		
	0,651	10,045		
	0,644	9,966		
	0,647	10,000		
	0,655	10,089		
	0,637	9,888		
	0,652	10,056		
	0,661	10,156		
40 ppb	3,246	39,039	97,7	0,90
	3,269	39,296		
	3,258	39,173		
	3,238	38,950		
	3,211	38,648		
	3,317	39,832		
	3,221	38,760		
	3,217	38,715		
	3,267	39,274		
	3,264	39,240		
160 ppb	14,187	161,285	100,5	0,85
	14,212	161,564		
	14,038	159,620		
	14,270	162,212		
	14,221	161,665		
	14,140	160,760		
	14,179	161,196		
	14,135	160,704		
	14,224	161,698		
	13,850	157,520		

Apendice D. *Precisión y exactitud día 2.*

Precisión y exactitud Día 2				
Concentración	Área	Concentración y = 0,08947x - 0,248	%Re	% C.V
10 ppb	0,660	10,145	101,0	1,44
	0,636	9,877		
	0,667	10,223		
	0,670	10,257		
	0,651	10,045		
	0,640	9,922		
	0,677	10,335		
	0,649	10,022		
	0,652	10,056		
	0,655	10,089		
40 ppb	3,334	40,022	100,0	1,59
	3,336	40,045		
	3,255	39,140		
	3,390	40,648		
	3,327	39,944		
	3,283	39,453		
	3,417	40,950		
	3,337	40,056		
	3,400	40,760		
	3,256	39,151		
160 ppb	14,351	163,117	100,9	0,67
	14,249	161,978		
	14,239	161,866		
	14,132	160,670		
	14,212	161,564		
	14,289	162,425		
	14,038	159,620		
	14,081	160,101		
	14,186	161,274		
	14,259	162,089		

Apendice E. *Precisión y exactitud día 3.*

Precisión y exactitud Día 3				
Concentración	Área	Concentración y = 0,08947x - 0,248	%Re	% C.V
10 ppb	0,663	10,179	100,3	0,89
	0,644	9,966		
	0,649	10,022		
	0,659	10,134		
	0,661	10,156		
	0,649	10,022		
	0,643	9,955		
	0,644	9,966		
	0,644	9,966		
	0,643	9,955		
40 ppb	3,265	39,251	99,8	1,17
	3,343	40,123		
	3,361	40,324		
	3,360	40,313		
	3,343	40,123		
	3,346	40,156		
	3,360	40,313		
	3,255	39,140		
	3,281	39,430		
	3,349	40,190		
160 ppb	14,039	159,631	100,7	0,85
	14,379	163,430		
	14,034	159,575		
	14,279	162,313		
	14,174	161,140		
	14,266	162,168		
	14,091	160,212		
	14,275	162,268		
	14,071	159,989		
	14,076	160,045		

Apendice F. *Datos obtenidos para 50 muestras reales.*

Código	Peso (g)	Área	Concentración [ppb] y = 0,0895x - 0,248	mg ANA	mg/kg ANA	% C.V
25P021_G1_001	1,0252	0,057	3,408	6,8156E-06	0,0066	
25P021_G1_002	1,0118	0,057	3,408	6,8156E-06	0,0067	
25P021_G1_003	1,0045	0,064	3,486	6,9721E-06	0,0069	
25P021_G1_004	1,0014	0,056	3,397	6,7933E-06	0,0068	
25P021_G1_005	1,0045	0,038	3,196	6,3911E-06	0,0064	
25P021_G1_006	1,0213	0,072	3,575	7,1508E-06	0,0070	
25P021_G1_007	1,0032	0,050	3,330	6,6592E-06	0,0066	
25P021_G1_008	1,0239	0,074	3,598	7,1955E-06	0,0070	
25P021_G1_009	1,0150	0,062	3,464	6,9274E-06	0,0068	
25P021_G1_010 (1)	1,0141	0,048	3,307	6,6145E-06	0,0065	1,32
25P021_G1_010 (2)	1,0161	0,056	3,397	6,7933E-06	0,0067	
25P021_G1_010 (3)	1,0168	0,055	3,385	6,7709E-06	0,0067	
25P021_G1_011	1,0031	0,056	3,397	6,7933E-06	0,0068	
25P021_G1_012	1,0242	0,058	3,419	6,8380E-06	0,0067	
25P021_G1_013	1,0030	0,060	3,441	6,8827E-06	0,0069	
25P021_G1_014	1,0103	0,053	3,363	6,7263E-06	0,0067	
25P021_G1_015	1,0116	0,087	3,743	7,4860E-06	0,0074	
25P021_G1_016	1,0184	0,078	3,642	7,2849E-06	0,0072	
25P021_G1_017	1,0167	0,087	3,743	7,4860E-06	0,0074	
25P021_G1_018	1,0075	0,081	3,676	7,3520E-06	0,0073	
25P021_G1_019	1,0143	0,073	3,587	7,1732E-06	0,0071	
25P021_G1_020 (1)	1,0138	0,064	3,486	6,9721E-06	0,0069	2,82
25P021_G1_020 (2)	1,0265	0,052	3,352	6,7039E-06	0,0065	
25P021_G1_020 (3)	1,0191	0,052	3,352	6,7039E-06	0,0066	
25P021_G1_021	1,0171	0,032	3,128	6,2570E-06	0,0062	
25P021_G1_022	1,0208	0,066	3,508	7,0168E-06	0,0069	
25P021_G1_023	1,0057	0,069	3,542	7,0838E-06	0,0070	
25P021_G1_024	1,0167	0,082	3,687	7,3743E-06	0,0073	
25P021_G1_025	1,0204	0,070	3,553	7,1061E-06	0,0070	
25P021_G1_026	1,0259	0,032	3,128	6,2570E-06	0,0061	
25P021_G1_027	1,0042	0,047	3,296	6,5922E-06	0,0066	
25P021_G1_028	1,0138	0,038	3,196	6,3911E-06	0,0063	
25P021_G1_029	1,0268	0,074	3,598	7,1955E-06	0,0070	
25P021_G1_030 (1)	1,0051	0,092	3,799	7,5978E-06	0,0076	0,68
25P021_G1_030 (2)	1,0155	0,094	3,821	7,6425E-06	0,0075	
25P021_G1_030 (3)	1,0127	0,090	3,777	7,5531E-06	0,0075	
25P021_G1_031	1,0165	0,057	3,408	6,8156E-06	0,0067	
25P021_G1_032	1,0142	0,036	3,173	6,3464E-06	0,0063	
25P021_G1_033	1,0158	0,041	3,229	6,4581E-06	0,0064	
25P021_G1_034	1,0141	0,039	3,207	6,4134E-06	0,0063	
25P021_G1_035	1,0143	0,068	3,531	7,0615E-06	0,0070	
25P021_G1_036	1,0176	0,025	3,050	6,1006E-06	0,0060	
25P021_G1_037	1,0016	0,027	3,073	6,1453E-06	0,0061	

25P021_G1_038	1,0206	0,037	3,184	6,3687E-06	0,0062	
25P021_G1_039	1,0158	0,040	3,218	6,4358E-06	0,0063	
25P021_G1_040 (1)	1,0270	0,042	3,240	6,4804E-06	0,0063	1,63
25P021_G1_040 (2)	1,0074	0,039	3,207	6,4134E-06	0,0064	
25P021_G1_040 (3)	1,0192	0,049	3,318	6,6369E-06	0,0065	
25P009_G12_001-1	1,0101	0,069	3,542	7,0838E-06	0,0070	
25P009_G12_001-2	1,0064	0,061	3,453	6,9050E-06	0,0069	
25P009_G12_001-3	1,0060	0,076	3,620	7,2402E-06	0,0072	
25P009_G12_001-4	1,0126	0,060	3,441	6,8827E-06	0,0068	
25P009_G12_001-5	1,0104	0,082	3,687	7,3743E-06	0,0073	
25P009_G12_001-6	1,0213	0,084	3,709	7,4190E-06	0,0073	
25P009_G12_001-7	1,0212	0,096	3,844	7,6872E-06	0,0075	
25P009_G12_001-8	1,0195	0,085	3,721	7,4413E-06	0,0073	
25P009_G12_001-9	1,0050	0,062	3,464	6,9274E-06	0,0069	
25P009_G12_001-10	1,0065	0,079	3,654	7,3073E-06	0,0073	