

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Validación del método analítico por espectrofotometría
UV para la cuantificación de flavonoides totales en
Calceolaria engleriana Kraenzl "wawillay".

Ayacucho – 2016

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por el:

Bach. CORONADO BENDEZÚ Raúl Nemecio

AYACUCHO – PERÚ

2016

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D. N° 194-2016-FCSA-UNSCH

Bach. Raúl Nemecio CORONADO BENDEZÚ

En la ciudad de Ayacucho siendo las tres de la tarde del día martes trece de setiembre del año dos mil dieciséis en el local del Centro Tecnológico Informático, reunido para el acto de sustentación y precedidos por el Dr. Edwin Enciso Roca (por delegación) con la asistencia de los docentes Maricela López Sierralta (quien además actuara como secretaria docente); QF. Hugo Luna Molero; Mg. Edgar Cárdenas Landeo (cuarto jurado) y Mg. Marco Árones Jara (asesor) para recepcionar la tesis titulada "Validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales en *Calceolaria engleria kraenzl "wawillay"*" Ayacucho 2016 presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica Raúl Nemecio Coronado Bendezú pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutico.

El presidente (e) inicia el acto de sustentación, dando lectura a la Resolución Decanal N° 194-2016-FCSA-UNSCH y luego de verificar los documentos en mesa autoriza al sustentante iniciar la exposición del trabajo de investigación en un tiempo no mayor a cuarenta minutos.

El sustentante inicio su exposición haciendo uso de dispositivas para una mejor explicación del trabajo de investigación. Culminada esta etapa el presidente (e) sede la palabra a los profesores del jurado calificador para que realicen las aclaraciones, observaciones y preguntas que crean convenientes.

Seguidamente el presidente (e) solicita al sustentante y público en general para que abandonen el ambiente dejando al jurado calificador para que puedan deliverar y calificar como sigue;

JURADO CALIFICADOR	TEXTO	EXPOSICIÓN	RPTA. A PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Maricela López Sierralta	18	18	18	18
Mg. Edgar Cárdenas Landeo	18	18	18	18
QF. Hugo Luna Molero	18	18	18	18
Mg. Marco Arones Jara	18	18	17	18
			Promedio total	18

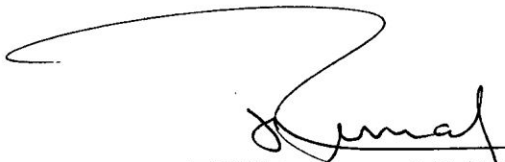
De la calificación realizada, el sustentante obtiene la nota promedio de dieciocho (18) de lo cual dan fe los miembros del jurado calificador estampando su firma al pie de lo prescrito. Culmina el acto de la sustentación siendo las cinco de la tarde.




Dr. Edwin Enciso Roca
Presidente (e)




Mg. Mañicela López Sierralta
Miembro-secretaria Doc.



QF. Hugo Luna Molero
Miembro



Mg. Edgar Cárdenas Landeo
Mbro. - 4^{to} Jurado



Mg. Marco Arones Jara
Miembro - Asesor

A mi familia por su cariño y
apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; por haberme acogido durante los años de formación profesional.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, y en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica.

A los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, los cuales contribuyeron con mi formación académica, al Mg. Q.F. Marco Rolando Aronés Jara y Q.F. Liselly Chauca Retamozo, por compartir sus conocimientos y orientaciones que hicieron posible el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	v
Índice general	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xiii
Resumen	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. ANTECEDENTES	3
2.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	4
2.2.1. Justificación de la validación	4
2.2.2. Métodos susceptibles de ser validados	5
2.2.3. Entorno legal	5
2.2.4. Criterios de evaluación en función del tipo de método analítico	6
2.2.5. Parámetros de validación de métodos analíticos	7
2.2.5.1. Exactitud	7
2.2.5.2. Precisión	8
2.2.5.3. Selectividad o especificidad	10
2.2.5.4. Límite de detección y límite de cuantificación	10
2.2.5.5. Linealidad	12
2.3. CROMATOGRAFÍA	12
2.4. ESPECTROFOTOMETRÍA	13
2.5. ASPECTOS BOTÁNICOS DE <i>Calceolaria engleriana</i> kraenzl.	15
2.6. COMPUESTOS FENÓLICOS	17
2.6.1. Flavonoides	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIONES	39
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Datos requeridos para la validación de métodos analíticos.	7
Tabla 2. Variación de factores en el estudio de la precisión.	8
Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de la droga cruda de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2016.	30
Tabla 4. Variación de la medición de absorbancia de la solución estándar de quercetina 4µg/mL, para determinar la precisión. Ayacucho 2016.	33
Tabla 5. Variación del contenido de quercetina en hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", para determinar la repetibilidad. Ayacucho 2016.	34
Tabla 6. Variación del contenido de quercetina en las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", para determinar la precisión intermedia. Ayacucho 2016.	35
Tabla 7. Porcentaje de recuperación de quercetina en las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", para determinar la exactitud. Ayacucho 2016.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cromatografía en capa fina del estándar de quercetina comparada con la muestra. Ayacucho 2016.	31
Figura 2. Variación de la absorbancia en función de la concentración de quercetina, para el test de linealidad. Ayacucho 2016.	32
Figura 3. Espectros de absorción UV del estándar de quercetina y la muestra. Ayacucho 2016.	37
Figura 4. Variación de la absorbancia en función de la concentración de quercetina, para determinar la sensibilidad. Ayacucho 2016.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de la especie <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2016.	54
Anexo 2. Concentración y absorbancia requerida para la curva de calibración del estándar de quercetina. Ayacucho 2016.	55
Anexo 3. Dispersión de las tres curvas matrices de la solución estándar de quercetina. Ayacucho 2016.	56
Anexo 4. Variabilidad de los factores de respuesta de la solución estándar de quercetina. Ayacucho 2016.	57
Anexo 5. Variación de la medición de absorbancia de quercetina a concentraciones menores, para determinar la sensibilidad. Ayacucho 2016.	58
Anexo 6. Obtención del valor de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Ayacucho 2016.	59
Anexo 7. Matriz de consistencia.	60

RESUMEN

La validación de un método es aquel proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas; esta capacidad se expresa en términos de linealidad, precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad. La presente investigación es de tipo básico descriptivo que tiene como objetivo validar el método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales en las hojas de *Calceolaria engleriana* kraenzl "wawillay", expresados como quercetina. Las muestras fueron recolectadas de la comunidad de Huaraca, anexo de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Para validar la metodología se prepararon soluciones a diferentes concentraciones tanto de la muestra como del estándar para después evaluar los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. Se demostró la linealidad del estándar con la ecuación de la recta, con coeficientes de determinación y correlación (r^2 y r) mayores de 0,995; precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia con resultados de coeficiente de variación 0,260 % y 0,315 % respectivamente; exactitud 99,802 % de recuperación; límite de detección y límite de cuantificación de 0,003 y 0,004 ug/mL de quercetina respectivamente. La aplicabilidad del método validado se evaluó en la droga vegetal "wawillay", obteniéndose una concentración de $41,99 \pm 0,15$ % de quercetina. Se concluyó que el método es válido.

Palabras claves: validación, método analítico, quercetina, espectrofotometría.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Éste saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos; para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo. Sin embargo, a pesar de los avances, éste saber no ha perdido su importancia, por el contrario, el desarrollo de los medicamentos modernos ha sido resultado de formas cada vez más complejas de aprovecharlas y su producción sigue dependiendo en gran parte de su uso, como materia prima, la identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por el uso de la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación fitoquímica.¹

El estudio fitoquímico de las plantas usadas en medicina popular es importante ya que mediante él, es posible la identificación de los metabolitos responsables de su acción terapéutica y con ella una base científica para su uso apropiado; además estos trabajos de investigación contribuyen a un mejor conocimiento de las plantas medicinales, las cuales pueden ser extendidos a estudios farmacológicos, que justifiquen su acción biológica.²

Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes ampliamente en la naturaleza, son responsables del buen funcionamiento de las plantas y sus beneficios para la salud humana han sido bien reconocidos en varios estudios, uno de estos es su conocida capacidad antioxidante, llegándose a utilizar los flavonoides para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares.³

La validación es uno de los elementos básicos en sistemas de calidad. El hecho de validar trata de disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato generado, a través de la realización de un trabajo analítico dentro de unos parámetros definidos. La validación de un método analítico provoca una mayor fiabilidad y aceptación de los datos generados. Entre los parámetros analíticos más utilizados se encuentran: exactitud, sesgo, precisión, linealidad, repetibilidad, límite de detección y de cuantificación, sensibilidad, entre otros.⁴

La especie *Calceolaria engleriana* Kraenzl, comúnmente conocida como "wawillay", es una planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae. Se sabe que la distribución de *Calceolaria* va del sur de la Sierra Madre Occidental en México, hasta los Andes del sur, la mayoría de las especies están en alturas que oscilan los 2 000 a 4 000 m.s.n.m.⁵

Teniendo en cuenta el amplio uso del "wawillay" para tratamientos, prevenciones y curaciones de enfermedades y el factor de no disponer de un método de referencia descrito en farmacopeas se hace necesario disponer de métodos validados confiables de cuantificación de la sustancia activa como es la quercetina utilizando el espectrofotómetro UV-Vis. Los objetivos trazados en esta investigación fueron:

Objetivos generales

Validar el método analítico para la cuantificación de flavonoides totales en *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" por espectrofotometría UV.

Objetivos específicos

- Identificar la presencia de flavonoides totales en la droga cruda de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".
- Determinar el factor de retención del estándar de quercetina y la muestra mediante cromatografía en capa fina.
- Determinar la linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación del método analítico por espectrofotometría UV.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Hasta la actualidad ninguna obra oficial ni trabajos de investigación han desarrollado un método para la cuantificación de flavonoides totales en el extracto obtenido a partir de las hojas de la *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" por el método espectrofotométrico UV. Sin embargo existen estudios de validación y cuantificación por espectrofotometría UV desarrollada por otros investigadores entre ellos determinan la presencia y cuantifican los flavonoides totales, fenoles en diferentes extractos vegetales utilizando diferentes metodologías para la obtención de los extractos y asimismo sus resultados.

En la Universidad de la Habana se realizó el estudio de "Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides(quercetina) en *Psidium Guajaba* L.", el cual demostró que ambos métodos espectrofotométricos cumplen con todos los requisitos de validación propuestos por el control químico de calidad de la especie (linealidad, precisión, exactitud y especificidad) asimismo se cuantificó los flavonoides por el método espectrofotométrico a una longitud de onda de 258 nm para flavonoides totales expresados como quercetina, de Kostennikova Z. y modificado por Méndez G.⁶

En la Universidad Federal de Pernambuco de Brasil se realizó el estudio de "Validación de procedimientos para la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales en la hojas de *Bauhinia forficata* Link" en el cual concluye que los procedimientos para la determinación espectrofotométrica de los flavonoides totales validados en este trabajo presentan desempeño dentro de las especificaciones sanitarias preconizadas para el método bioanalíticos para los parámetros de linealidad, especificidad, sensibilidad, exactitud.⁷

En Brasil se realizó el estudio de "Desenvolvimento y validación de métodos analíticos para cuantificación de flavonoides totales y canferitrina en hojas de

Bauhinia forficata Link (Fabaceae) ” utilizando el método de hidrólisis ácida para cuantificar flavonoides totales expresados como quercetina por el método espectrofotométrico en una longitud de onda de 408 nm, el cual demostró que el método presenta adecuados parámetros de validación como sensibilidad, precisión, exactitud y robustez, establecidas por las normas oficiales.⁸

En el país de Colombia se realizó la investigación “Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de *Glycyne max* (soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*” los resultados mostraron la obtención de un 16,53 % de flavonoides totales expresados como quercetina utilizando el método espectrofotométrico a la longitud de onda de 258 nm.⁹

En la Universidad Nacional de Trujillo se realizó el estudio de “Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante” el cual obtuvo resultados de 1,6 % en té verde y 1,12 % en té negro de flavonoides totales expresados como quercetina por el método espectrofotométrico utilizando una longitud de onda de 258 nm.¹⁰

En la Universidad Nacional de Trujillo se realizó el estudio titulado “Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región de amazonas”, los flavonoides totales se cuantificaron por el método espectrofotométrico UV a una longitud de onda de 258 nm. Donde se obtuvieron valores de 1,8 y 2,5 gramos equivalentes a quercetina por cada 100 gramos de hoja seca respectivamente.¹¹

2.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.¹²

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplan los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo, robustez.¹³

2.2.1. Justificación de la validación

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las

pruebas documentales al respecto.¹²

- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.¹²
- Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico, sino también cumplir con la exigencia legal tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de la Buenas Prácticas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.¹²
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de método analítico.¹²

2.2.2. Métodos susceptibles de ser validados

Son validados los métodos analíticos clasificados en la siguiente forma:

- Ensayos de identificación.¹²
- Ensayos para la determinación de analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.¹²
- Ensayos para la determinación de características inherentes (ejemplo: test de disolución).¹²
- Ensayos de límite de impurezas y de cuantificación de impurezas.¹²
- Ensayos para la determinación de analito en fluidos biológicos y e productos naturales.¹²
- Ensayos microbiológicos.¹²

2.2.3. Entorno legal

2.2.3.1. Norma de correcta fabricación de medicamentos

Las normas de correcta fabricación de medicamentos en el capítulo de control de calidad indican que los métodos de análisis deben estar validados. De igual forma las Buenas Prácticas de Manufactura de los E.E.U.U. indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados.¹²

2.2.3.2. Farmacopeas

Validación frente a los métodos oficiales y/o de farmacopeas:

Se puede diferenciar entre validación de métodos de análisis de principios activo y especialidades farmacéuticas.¹²

Principios activos de síntesis: los métodos oficiales o Farmacopeas se consideran validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis y por lo tanto el mismo perfil de impureza que aquellos

para los que fuera redacta la monografía.¹²

Especialidades: no es recomendable considerar ningún método oficial o de farmacopea totalmente validado para una especificación, puesto que difícilmente tendrá los mismos componentes ni la misma proporción de estos.

No obstante pueden emplearse como punto de partida métodos desarrollados para especialidades tipo, como pueden ser los de Farmacopea Europa (EP), Farmacopea Americana (USP) o Farmacopea Británica (BP), que permitan obviar una gran parte del desarrollo analítico.¹²

2.2.4. Criterios de evaluación en función del tipo de método analítico

Los requisitos de las pruebas farmacopéicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Estas categorías se indican a continuación:¹³

a) Categoría I. Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.¹³

b) Categoría II. Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.¹³

c) Categoría III. Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).¹³

d) Categoría IV. Pruebas de identificación.¹³

Al validar métodos de propiedades físicas, se deben considerar las mismas características de desempeño requeridas para cualquier procedimiento analítico. Asimismo, se debe evaluar el uso de las características de desempeño para cada caso en particular, a fin de determinar que el procedimiento es adecuado para el uso previsto. Los criterios de aceptación específicos para cada parámetro de validación deben ser congruentes con el uso previsto para el método.

Los métodos físicos también se pueden clasificar en las cuatro categorías de validación. Por ejemplo, la validación de un método espectroscópico cuantitativo puede implicar la evaluación de características de desempeño analítico de categoría I o categoría II dependiendo de los requisitos del método.¹³

Tabla 1. Datos requeridos para la validación de métodos analíticos.¹³

Parámetros de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantificación	Ensayo límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Rango	Sí	Sí		*	No

*Pueden requerirse, según la naturaleza de la prueba

2.2.5. Parámetros de validación de métodos analíticos

Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación son los siguientes:

2.2.5.1. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como el valor verdadero o un valor referencia y el valor experimental encontrado. No debe confundirse la exactitud y precisión, la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que esta del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.¹²

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿Cuál es el valor verdadero del analito en la muestra?, el valor verdadero en muchos casos se desconoce. No obstante, cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón, o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón. También se acepta la comparación de resultados con un método de referencia validado del que ya se ha demostrado su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.¹²

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero.¹⁴

2.2.5.2. Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La procedencia de las muestras destinadas al estudio de precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio. El objeto del estudio de la precisión es conocer la variabilidad método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, entre otros.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.¹²

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar (δ), estimada analíticamente por la varianza (s) o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). Ambos estimadores, desviación estándar y desviación estándar relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media).¹⁴

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre:

- **El sistema:** Evaluando la dispersión de al menos seis lecturas del estándar.
- **El método:** Evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento.¹⁴

Tabla 2. Variación de factores en el estudio de la precisión.¹²

	Repetibilidad	Precisión inmediata	Reproducibilidad
Instrumento	Igual	Diferente	Diferente
Día de análisis	Igual	Diferente	Diferente
Analista	Igual	Diferente	Diferente
Otros factores	Igual	Diferente	Diferente
Laboratorio	Igual	Igual	Diferente

a) Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista,

con los mismos aparatos y reactivos, entre otros), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.¹²

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas. Uno de los factores que pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Por otro lado el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación especificado en el método de análisis. El número de réplicas se deduce a partir del coeficiente de variación de repetibilidad del método.¹²

b) Repetibilidad del sistema instrumental

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de seis a diez veces. En el caso que se analice el principio activo de una materia prima o de una especificación farmacéutica se prepara la muestra a la concentración nominal.¹²

c) Repetibilidad del método

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y mismo analista. Se proponen dos alternativas para realizar este estudio: un mínimo de seis muestras a la concentración nominal.¹²

d) Precisión inmediata

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, entre otros) y en un mismo laboratorio. El objeto del estudio de precisión inmediata es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.¹²

e) Reproducibilidad

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el

método.¹²

2.2.5.3. Selectividad o especificidad

Es la capacidad de un método para determinar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes u otras sustancias presentes en la muestra, se relaciona con el término de selectividad. La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analito de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.¹²

Frecuentemente el termino especificidad se utiliza como sinónimo del anterior, aunque debería reservarse para aquellas situación donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere procedimientos analíticos que emplea instrumentación no especifica. Como hay pocos métodos que den respuesta sólo a un único analito, el termino selectividad es normalmente más apropiado.¹²

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- Distorsionar la respuesta del analito (afecta normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.

La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.¹²

2.2.5.4. Límite de detección y límite de cuantificación

Dado un método analítico determinado, se entiende por límite de cuantificación (LQ) de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra.¹²

El límite de cuantificación se expresa habitualmente como concentración de analito (por ejemplo: porcentaje, partes por billón) en la muestra. Para procedimientos no instrumentales el límite de cuantificación se determina

habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo, del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables. En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH (conferencia Internacional sobre Armonización) describen un enfoque común, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del enfoque utilizado, el límite de cuantificación deberá validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras que se sepa que están cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas al límite de cuantificación.¹³

El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. La cantidad mínima de la muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad del analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo: porcentaje, partes por millón, entre otras).¹²

Para procedimientos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH (conferencia Internacional sobre Armonización) describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 o 3:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar

de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite.¹³

2.2.5.5. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o promedio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se busca una respuesta de tipo lineal que facilitara su trazado, interpolación e interpretación.¹²

La linealidad en un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras en un intervalo dado. La linealidad se refiere a la relación entre la concentración y la medida de valoración. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta, ya sea lineal o no.¹³

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco diluciones de un estándar, comprendiendo los ámbitos estimados de trabajo con un exceso de al menos 50% sobre el límite superior y un defecto de 50 % debajo del límite inferior. Estas soluciones se leerán al menos por duplicado y se determina la curva de regresión: $y = bx+a$, donde: a corresponde al estimador de la ordenada y b , la pendiente. Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado (por ejemplo, $p=0,05$).¹⁴

2.3. CROMATOGRAFÍA

Las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido absorbido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar empacada en una columna, extendida como una capa, distribuida como película o aplicada mediante otras técnicas. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida o un fluido supercrítico. La separación puede basarse en adsorción, distribución de masa (partición) o intercambio iónico; o

puede basarse en diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como tamaño, masa o volumen.¹³

Los tipos de cromatografía útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo que se emplean en los procedimientos cromatográficos de la USP (Pharmacopea de los Estados Unidos) son: cromatografía en columna, de gases, en papel, en capa delgada (incluyendo la cromatografía en capa delgada de alta resolución) y de líquidos presurizados (comúnmente llamada cromatografía líquida de alta presión o alta resolución).¹³

2.3.1. Cromatografía en capa delgada

La fase estacionaria es una capa relativamente delgada y uniforme de material seco y reducido a polvo fino que se aplica sobre una lámina o placa de vidrio, plástico o metal (generalmente conocida como la placa). La fase estacionaria para la cromatografía en capa fina tiene un tamaño de partícula promedio de 10-5 μm .¹³

La muestra aplicada a la región pre adsorbente se desarrolla en forma de bandas estrechas y definidas en la interface entre el pre adsorbente y el sorbente. Las separaciones logradas pueden basarse en la adsorción, la partición o una combinación de ambos efectos, según el tipo específico de fase estacionaria. A menudo se usa una fuente de luz ultravioleta (UV) adecuada para observaciones bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), así como una variedad de soluciones reveladoras para visualizar las manchas.¹³

2.4. ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría de absorción es la medición de una interacción entre una radiación electromagnética y las moléculas o átomos de una sustancia química. Las técnicas que se emplean frecuentemente en el análisis farmacéutico incluyen la espectroscopia de absorción atómica, en el espectro UV, en el visible y en el IR. La medición espectrofotométrica en la región visible anteriormente se denominaba colorimetría; sin embargo, es más preciso emplear el término "colorimetría" sólo en aquellos casos en que se considera la percepción humana del color. El intervalo de longitud de onda disponible para estas mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta del UV hasta el IR. Por conveniencia, este intervalo espectral está aproximadamente dividido en el UV (190 a 380 nm), el visible (380 a 780 nm), el IR cercano (780 a 3 000 nm) y el IR (2,5 a 40 μm o 250 a 4 000 cm^{-1}).¹³

En el caso de muchas sustancias farmacéuticas, las mediciones pueden hacerse con mayor exactitud y sensibilidad en las regiones del UV y visible del espectro que en las del IR cercano e IR. Cuando se observan soluciones en celdas de

1 cm, las concentraciones de aproximadamente 10 µg de muestra por mL, a menudo producen absorbancias entre 0,2 y 0,8 en el UV o la región de luz visible. En el IR e IR cercano, pueden ser necesarias concentraciones de 1 a 10 mg por mL y de hasta 100 mg por mL, respectivamente, para que se produzca una absorción suficiente; para estos intervalos espectrales, se utilizan celdas con longitudes de 0,01 mm a más de 3 mm.¹³

Por lo general, los espectros UV y visible de las sustancias no tienen un alto grado de especificidad. Sin embargo, son muy apropiados para realizar valoraciones cuantitativas y, en el caso de muchas sustancias, son útiles como medios adicionales de identificación.¹³

2.4.1. Ley de Beer

La potencia de un haz de luz radiante disminuye en relación con la distancia que recorre en un medio de absorción. También disminuye en relación a la concentración de moléculas o iones absorbentes con los que se encuentra en ese medio. Estos dos factores determinan la proporción de la energía incidente total que emerge. La disminución de la potencia de una radiación monocromática que atraviesa un medio de absorción homogéneo se determina cuantitativamente mediante la ley de Beer.¹³

$$\text{Log}_{10} \frac{1}{T} = A = a \cdot b \cdot c$$

En donde los términos son los definidos a continuación:

2.4.1.1. Absorbancia (A). Es el logaritmo, en base 10, del recíproco de la transmitancia (T).¹³

$$A = -\text{Log}_{10} T$$

2.4.1.2. Absortividad (a). Es el cociente de la absorbancia (A) dividido por el producto de la concentración de la sustancia (c), expresada en g por L, y la longitud de paso de absorción (b) en cm, tiene unidades de $\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.¹³

2.4.1.3. Absortividad Molar (ε). Es el cociente de la absorbancia (A) dividido por el producto de la concentración de la sustancia, expresado en moles por L y la longitud de paso de absorción en cm. También es el producto entre la absortividad (a) y el peso molecular de la sustancia, tiene unidades de $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, entonces la absorbancia es:¹³

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

2.4.1.4. Espectro de Absorción. Es una representación gráfica de la absorbancia, o cualquier función de absorbancia, en función de la longitud.¹³

2.4.1.5. Transmitancia (T). Es el cociente entre la potencia radiante transmitida por una muestra y la potencia radiante incidente sobre la muestra.¹³

$$T = \frac{I}{I_0}$$

2.5. ASPECTOS BOTÁNICOS DE *Calceolaria engleriana* kraenzl

2.5.1. Clasificación taxonómica de *Calceolaria engleriana* “wawillay”.

- División : MAGNOLIOPHYTA
- Clase : MAGNOLIOPSIDA
- Subclase : ASTERIDAE
- Orden : SCROPHULARIALES
- Familia : SCROPHULARIACEAE
- Género : *Calceolaria*
- Especie : *Calceolaria engleriana*. Kraenzl.
- Nombre común : “wawillay”

Fuente: Constancia emitida por el Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. (Anexo 1).

2.5.2. Descripción botánica del género *Calceolaria*

Tradicionalmente considerado como parte de la familia Scrophulariaceae, el género *Calceolaria* fue elevado al rango de familia cuando las Scrophulariaceae fueron encontradas polifiléticas. Desde entonces, forma la familia Calceolariaceae.¹⁵

El género *calceolaria* se caracteriza por que son plantas herbáceas anuales o perennes, algunas veces arbustos o sub arbustos pequeños, hojas alternas, opuestas y verticiladas sin estípula, flores amarillas solitarias o dispuestas en inflorescencias racimosas o cimosas, son hermafroditas, zigomorfas en mayor o menor grado, pentámeras. Cáliz con cinco sépalos iguales, lobados o con el posterior más o menos reducido; corola bilabiada, usualmente amarilla, también tubular o embudada, labio superior formado por las dos piezas coralinas adaxiales; labio inferior formado por las 3 piezas coralinas adaxiales, sacciforme y de mayor tamaño que el labio superior, normalmente con una zona de tricomas glandulares secretoras de aceites llamado elaióforo. Estambres con dos o cuatro (dinamos), raras veces cinco, insertos en el tubo corolino. Ovario bilocular,

bicarpelar, súpero o semiífero, estilo entero bífido. Fruto cápsula o baya pluriseminada, dehiscente distalmente en 4 valvas. Semillas pequeñas, casi lineares, elipsoides y algo recurvadas, con tejido nutritivo.¹⁶

Su clasificación abarca unas 3000 especies que habitan sobre todo en regiones de clima templado en zonas montañosas algunas tienen importancia medicinal y otras son muy apreciadas como plantas ornamentales.¹⁶

2.5.3. Descripción botánica de la especie *Calceolaria engleriana* Kraenzl

Sub arbusto erecto que alcanza de 0,2 a 1,2 metros de altura, ramas rojizo marrones poco ramificado, con inflorescencia en cimas terminales multiflorales y parte distales de las ramas finamente tomentosa, pelos ascendentes, hojas herbáceas o subcoriáceas, lanceoladas (raramente ovado estrechamente elíptica), aguda cuneada o redondeada en la base, márgenes enteros deflexos de 2,8 – 8,2 por 0,9 – 2,6 cm, de color verde olivo en ambos lados, haz tomentoso algo deslucido, envés pinnado venoso, las venas tomentosas, interespacios glabros, glándulas sésiles inflorescencia compuesta de 1 - 2 pares de cimas de 8 flores, pedúnculos primarios de 2,3 – 10 cm, pedicelos 1 – 4 cm, la cima presenta brácteas. Sépalo elíptico u ovado, de color amarillo limón, con pocos pelos glandulares en la cara externa, internamente con pelos cortos, corola profundamente amarilla con puntos amarillos en el interior de la garganta, labio superior 3 - 5 x 5 – 7 mm labio inferior porción incurvada 17 - 25 x 12 – 20 mm, estambres con anteras de color amarillo con tecas opuestas, con filamento estaminal corto, fruto cápsula ovoide acuminada y glandular.¹⁵

2.5.4. Distribución geográfica del género *Calceolaria*

El género *Calceolaria engleriana*, conocida en Perú de los departamentos de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica y Puno entre los 2 000 – 4 500 m.s.n.m.¹⁵

En el Neotrópico, *Calceolaria* cuenta con 181 especies, siendo más abundante en la región central andina desde el norte del Perú hasta el centro de Bolivia. En esta región, el género es principalmente altoandino ocurriendo mayormente entre los 2 000-4 000 m.s.n.m. aunque algunas especies herbáceas habitan al nivel del mar en las formaciones de lomas; también se señaló el norte del Perú como el centro de diversidad de este género, concretamente los departamentos de Amazonas y Cajamarca. Otros lugares de elevada diversidad del género reportados por este mismo autor para nuestro país apuntan a las laderas

orientales de los Andes, concretamente en los departamentos de Huánuco, Junín, Pasco, y Cusco.¹⁵

2.5.3. Composición química del género Calceolaria.

Se han realizado diversos estudios sobre la composición química del género Calceolaria, identificando algunos compuestos químicos, como resultado de estudios fitoquímicos, donde se reportan la presencia de taninos, flavonoides, esteroides, quinolonas, cardenólidos, esteroides, anillos lactona, triterpenos y en los últimos años han sido reportados muchos nuevos diterpenos.¹⁷

Se realizaron el tamizaje fitoquímico de la especie *Calceolaria engleriana* donde se demostró la presencia de compuestos fenólicos como: taninos, flavonoides y catequinas; los terpenoides como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y/o esteroides y las quinonas.¹⁸

2.6. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más substituyentes hidroxilos, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua; pueden ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1 % de cloruro férrico. Dado la naturaleza aromática de estos compuestos fenólicos, ellos muestran intensa absorción en la región UV de espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo.¹⁷

2.6.1. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos, que se encuentran como pigmentos naturales presentes en los vegetales, semillas, frutas; son un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales.¹⁷

Se conocen como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C₆-C₃-C₆, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C cada una de las clases de flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa.¹⁷

Los flavonoides en forma glicósilada se hallan presentes en su mayoría en las

plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavanoles, y más restringidas las isoflavonas, chalconas y auronas.¹⁷

Los flavonoides se forman biogénicamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y a partir de la cual se derivan las otras clases por posteriores modificaciones que ocurran en varias etapas.¹⁷

Las técnicas cromatografías usadas para la separación de flavonoides o su detección en un extracto de planta son también muy variadas, la cromatografías en papel y placa son los más utilizados, en el cual se utilizan diferentes sistemas de solventes; la detección de los flavonoides en la cromatografía, puede hacerse por el color que desarrolla en el Vis o en el UV, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otras, las cuales se intensifican o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoníaco.¹⁷

Las técnicas espectrofotométricas más utilizadas o usuales para el análisis preliminar de la estructura de un flavonoide es quizá la absorción UV-Vis, esta técnica es usada tanto para identificar el tipo de flavonoide, los espectros de las flavonas y flavanoles muestran dos banda definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observa otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoides: las flavonas la muestran 310-350 nm, los flavanoles 3-O-sustituidos en 330-360 nm, y los flavanoles en 350-385 nm.¹⁷

Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales. Dentro del grupo de los flavonoides propiamente dicho, los más destacables por su interés farmacológico son las flavonas, flavanoles, flavanonas y sus correspondientes heterósidos. Además, algunos isoflavonoides son importantes por su efecto estrogénico y el de los compuestos directamente relacionados con los flavonoides (compuestos que conservan el sistema C₆-C₃-C₆ pero carecen del carbonilo en la posición 4) como son las antocianidinas, las catequinas y las leucoantocianidinas, destacan los antocianósidos.¹⁷

a) Flavonas. Como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C₃. Existen tres clases importantes: la tricetina, apigenina, luteolina.¹⁷

b) Flavonoles. Representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C. Los más importantes son: quercetina, miricetina y kaemferol.¹⁷

c) Flavanonas. Se caracterizan por tener saturado el anillo C del grupo flavonoide.

Las más importantes son naringenina y hesperetina.¹⁷

d) Isoflavonas. Las más importantes son genisteina y rotenona.¹⁷

e) Antocianidinas. Presentan unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Las más importantes son cianidina y delphinidina.¹⁷

f) Chalconas. Su estructura presenta el nucleo de la benzariden acetofenona y se caracteriza por contener un grupo -OH en la posición 2.¹⁷

g) Auronas. Se caracterizan por su estructura llamada benzacumarina.¹⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizará en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de marzo a agosto del 2016.

3.2. POBLACIÓN

La población estará constituida por las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca anexo Anchac - Huasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.

3.3. MUESTRA

1 kg de hojas desecadas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl, que fueron recolectadas durante el mes de marzo.

3.4. METODOLOGÍA Y RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1. Recolección y desecación de las hojas de *Calceolaria engleriana* kraenzl "wawillay"

La recolección de las muestras se realiza de acuerdo a las directrices de la Organización Mundial de salud (OMS) sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales, en los cuales nos indica como debe ser el proceso recolección, transporte y secado de las muestras.

Las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", fueron recolectadas al azar, en el Centro Poblado Waracca anexo Anchac - Huasi en el distrito de Vinchos, luego fueron lavadas con hipoclorito de sodio, secadas a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte cada 24 horas y removiendo el vegetal para evitar su descomposición, por un periodo de una semana.

3.4.2. Obtención de la muestra

Las hojas desecadas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", serán reducidas de tamaño utilizando el molino de martillo con malla de 1 mm aprox.

3.4.3. Tamizaje fitoquímico

Se realizarán según procedimientos descritos por Miranda y Cuéllar.¹⁹

3.4.4. Identificación de flavonoides totales por el método cromatográfico

Se llevará a cabo por el método de cromatografía en capa fina descrita en la Farmacopea Brasileña.²⁰

Las condiciones cromatografías fueron:

Fase estacionaria: sílica-gel G.

Fase móvil: acetato de etilo, agua y ácido fórmico anhidro (80:10:10)

Procedimiento: se aplica, separadamente, en la placa, en forma de banda, 10 µL de Solución (1) y 5 µL de la Solución (2), recientemente preparadas.

Solución (1): agitar, en ultrasonido, durante 10 minutos, una dispersión de 50 mg/mL del extracto en etanol y agua (1:1). Filtrar.

Solución (2): solución de 100 µg/mL de estándar en una mistura de etanol y agua (1:1).

Revelar: se examina sobre luz ultravioleta (365 nm). Las manchas obtenidas con la Solución (1) y la Solución (2).

3.4.5. Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría UV

Para la cuantificación de flavonoides totales se utilizará el método descrito por Kostennikova.²¹

a) Preparación de la muestra

Se reflujan 0,5 g de muestra dos horas con 20 mL de ácido sulfúrico al 10 % y 20 mL de etanol al 50 %, luego se enfría y se filtra con ayuda de vacío. El residuo se lava con 30 mL de etanol al 50 %; para desecharlo finalmente. El filtrado se evapora en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial, se enfría sobre baño de hielo durante 30 minutos y luego se filtra, se lava el precipitado formado con cuatro porciones de 10 mL de agua destilada fría (10-15°C). Se elimina el filtrado, los lavados, y el residuo tanto del filtro como del recipiente, se disuelve con 70 mL de etanol al 96 %, calentando previamente a 50°C; y finalmente la solución se trasvasa a una fiola de 100 mL y se completa el volumen con etanol al 96 %.

b) Preparación del estándar

Se pesará 0,04 g de quercetina, los cuales se disuelven con etanol al 96 % hasta

completar un volumen de 50 mL; de esta solución se toma 1 mL y se diluye a 100 mL con etanol al 50 %. Concentración aproximada 8,0 µg/mL (solución stock).

c) Blanco

El blanco consistirá en una solución de ácido sulfúrico al 10 % y etanol al 50 %; éste, la muestra y el estándar se leen a una longitud de onda de 258 nm.

3.4.5.1. Determinación del porcentaje de quercetina

$$x = \frac{A_m \times Pr \times 5}{A_r} \times 100$$

Donde:

X : contenido de flavonoides expresados como quercetina (%).

A_m : absorbancia de la solución muestra.

Pr : peso de la sustancia de referencia en gramos.

A_r : absorbancia de la solución de referencia.

3.4.5.2. Desarrollo de los parámetros de validación

3.4.5.2.1. Linealidad

Se evalúa la linealidad del sistema en el cual se preparan cinco soluciones estándar a partir de la solución stock correspondiente a 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 y 4,0 µg/mL se leerá tres réplicas de cada concentración. Luego se determina la recta de regresión lineal, el valor de: coeficiente de correlación (R), coeficiente de determinación (R²), pendiente (b) y el intercepto (a).

3.4.5.2.2. Precisión

Repetibilidad: se evalúa seis absorbancias de la solución estándar a la concentración de 4,0 µg/mL. Por el mismo analista, mismo día, mismo instrumento. Luego se determina la media y el coeficiente de variación.

Precisión intermedia: las muestras y los estándares se preparan de acuerdo a la metodología, en tres etapas y en diferentes sesiones. Día 1, 2 y 3: seis lecturas de las muestras al 100 % y estándar (solución stock). Luego se determina la media y el coeficiente de variación.

3.4.5.2.3. Exactitud

Se evalúa en función de porcentaje de recuperación mediante el método de enriquecimiento de la muestra con alícuotas de estándar. Para tal procedimiento se trabaja con tres concentraciones de 2,4; 3,2 y 4,0 µg/mL de quercetina. Se determina el porcentaje de recuperación utilizando la ecuación de la recta asimismo se determina la media, coeficiente de variación, t_{expe.} y t_{tabla.}

3.4.5.2.4. Selectividad o especificidad

Se evalúa las absorbancias de nueve repeticiones de la solución blanco o placebo, asimismo se determina el espectro de absorción UV del estándar y muestra. Luego se evalúa la desviación estándar del blanco y el recorrido del espectro de absorción del estándar y la muestra.

3.4.5.2.5. Sensibilidad

Se determinará por el método instrumental por comparación de blanco con blanco enriquecido a diferentes concentraciones. Se preparan el blanco enriquecido a diferentes concentraciones bajas de 0,008; 0,016; 0,032 µg/mL con una lectura de triplicado de cada concentración y el blanco solo. Luego se construye la regresión lineal de los blancos enriquecidos para determinar la pendiente, también se calcula el valor promedio de la señal del blanco y su desviación estándar. Con todos estos datos se determina el límite de detección y límite de cuantificación.

3.4.6. Tipo de investigación

Básico – descriptivo

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

3.5.1. Linealidad

El estudio de linealidad implica una representación gráfica y necesariamente una comprobación estadística.

Ecuación de la recta:

$$Y = bX + a$$

Donde:

X: la concentración del analito.

Y: valor de las respuestas del analito.

b: valor de la pendiente de la recta.

a: valor del intercepto de la recta con el eje Y.

a) Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación “r”

H₀: r = 0; No existe correlación entre X e Y.

H₁: r ≠ 0; Si existe correlación entre X e Y.

Criterios de aceptación: “r” debe ser significativamente diferente de cero. Si el valor de t_{experimental} obtenido es mayor que el t_{tabla} para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % (significancia α = 0,05), entonces existe correlación entre X e Y.

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

b) Test de linealidad (factor de corrección)

$$f = \frac{Y}{X}$$

Criterios de aceptación: CV \leq 5%

c) significancia estadística de la pendiente "b"

H₀: b = 0; No es significativamente igual a cero.

H₁: b \neq 0; Si es significativamente diferente de cero.

Varianza del error experimental: S² x, y

$$S^2_{xy} = \frac{\sum Y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

Varianza de la pendiente: S²b

$$S^2b = \frac{S^2_{xy}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$S_b = \sqrt{S^2b}$$

Límites de confianza de la pendiente:

$$b \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_b$$

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|b|}{S_b}$$

Criterios de aceptación: "b" debe ser significativamente diferente de cero. Si el valor de t_{experimental} obtenido es mayor que el t_{tabla} para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % (significancia $\alpha = 0,05$), entonces b es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula.

d) significancia estadística del intercepto "a"

H₀: a = 0; Es significativamente igual a cero.

H₁: a \neq 0; No es significativamente diferente de cero.

Varianza del intercepto: S²a

$$S^2a = S^2b * \frac{\sum x^2}{n}$$

Desviación estándar del intercepto: S a

$$S_a = \sqrt{S^2a}$$

Límites de confianza del intercepto:

$$a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a$$

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|a|}{S_a}$$

Criterios de aceptación: el valor de $t_{\text{experimental}}$ obtenido es menor que el t_{tabla} para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % (significancia $\alpha = 0,05$), entonces "a" no es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula.

3.5.2. Precisión

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de mediciones y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:

S: desviación estándar.

\bar{X} : media aritmética de los resultados.

3.5.3. Exactitud

Se determina por el método de porcentaje de recuperación:

$$\%R = \frac{\bar{X}}{X} \times 100$$

Donde:

\bar{X} : Absorbancia obtenida por la muestra enriquecida.

X : Absorbancia obtenida por el estándar.

Test de t student

Los valores de $t_{\text{experimental}}$ y el tabulado se comparan para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad y nivel de confianza de $\alpha = 0,05$. Si $t_{\text{exp.}} < t_{\text{tabla}}$, no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación y la exactitud es apropiada.

$$T_{\text{exper}} = \frac{|100 - \%R_{\text{promedio}}|}{(\%CV \times \sqrt{n})}$$

3.5.4. Sensibilidad

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se obtienen de la siguiente manera:

$$S_m = S_{bl} - KS_{de}$$

$$LD = \frac{S_m - S_{bl}}{m}$$

$$LC = \frac{S_m - S_{bl}}{m}$$

- S_m : señal analítica mínima distinguible.
 S_{bl} : señal media del blanco.
 S_{de} : desviación estándar del blanco.
 m : pendiente de la curva.
 K : valor establecidos (3 para LD y 10 para LC).

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de la droga cruda de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2016.

Metabolitos secundarios	Reactivos y/o reacciones	Resultados	Observaciones
Fenoles y/o taninos	Tricloruro férrico	+++	Coloración verde intenso
Flavonoides	Shinoda	++	Coloración amarillo en la fase amilica
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma
Catequinas	Catequinas	++	Fluorescencia verde carmelita al UV
	Dragendorff	+	Opalescencia ligera
Alcaloides	Wagner	-	Incoloro
	Mayer	+	Opalescencia ligera
Azucares reductores	Fehling	+++	Precipitado rojo
Quinonas	Borntrager	++	Presencia de color rosado

Leyenda:

Ausente : (-)
 Escasa : (+)
 Buena : (++)
 Excelente : (+++)

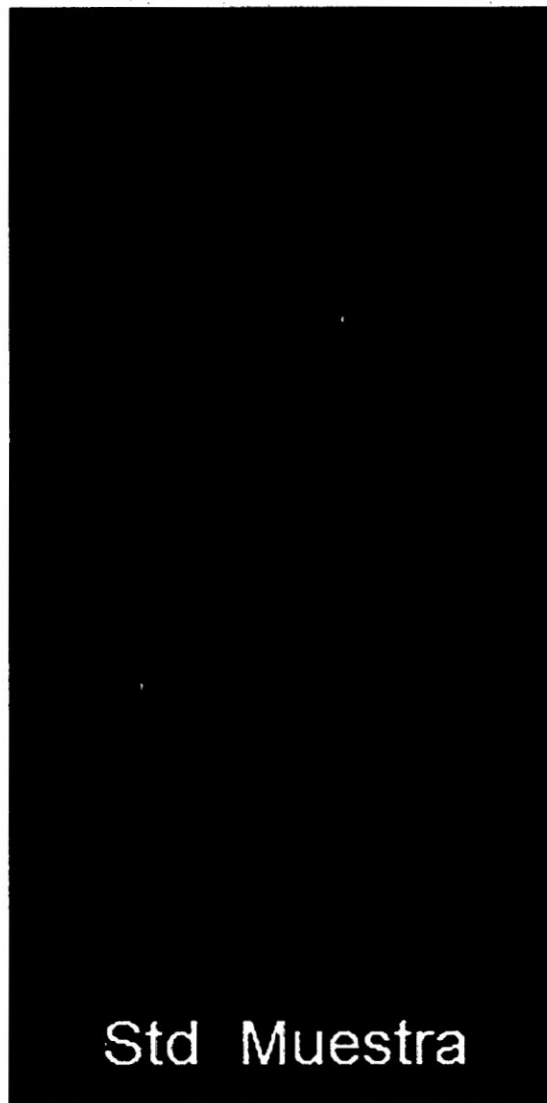


Figura 1. Cromatografía en capa fina del estándar de quercetina comparada con la muestra. Ayacucho 2016.

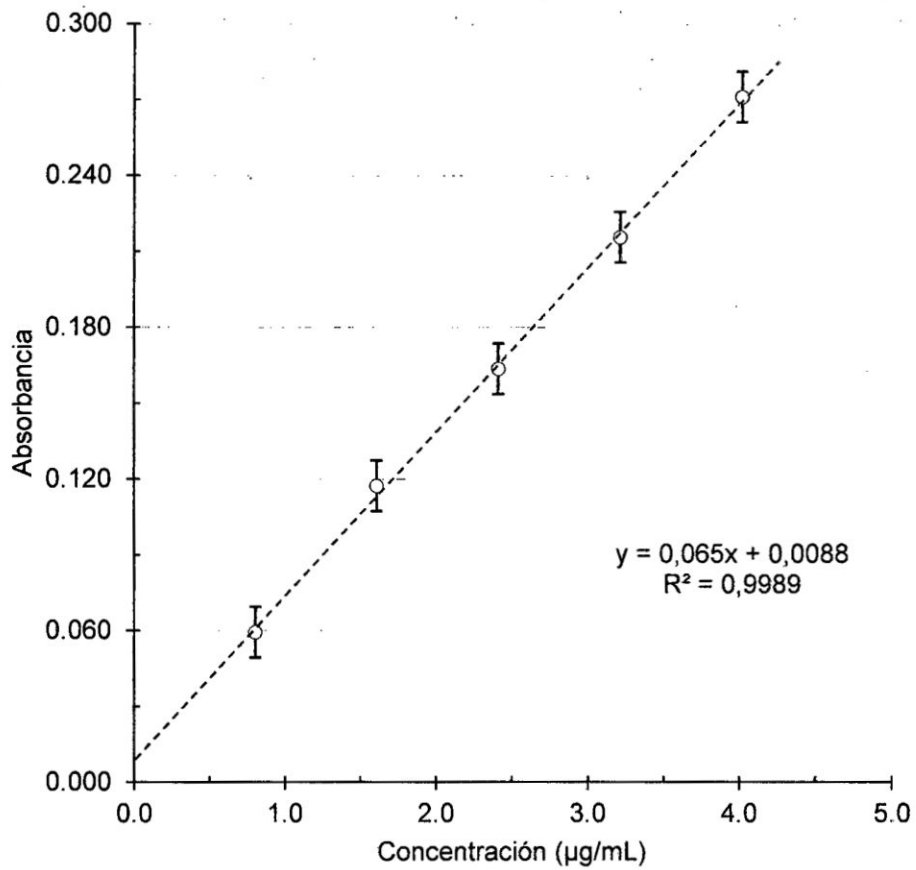


Figura 2. Variación de la absorbancia en función de la concentración de quercetina, para el test de linealidad. Ayacucho 2016.

Tabla 4. Variación de la medición de absorbancia de la solución estándar de quercetina 4 µg/mL, para determinar la precisión. Ayacucho 2016.

Muestras (N°)	Absorbancia
1	0,272
2	0,272
3	0,271
4	0,271
5	0,270
6	0,271
7	0,271
8	0,270
9	0,271
\bar{x}	0,271
s	0,00071
%C.V.	0,26 ^(a)

^(a)Especificación CV ≤ 1,5%

Tabla 5. Variación del contenido de quercetina en hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", para determinar la repetibilidad. Ayacucho 2016.

Muestra (N°)	A	Quercetina (g)	Quercetina (%)
1	1,097	0,422	42,20
2	1,095	0,421	42,10
3	1,098	0,422	42,20
4	1,095	0,420	42,00
5	1,095	0,421	42,10
6	1,096	0,421	42,10
		\bar{x}	42,12
		s	0,08
		%C.V.	0,190^(a)

^(a)Especificación C.V. \leq 1,5%

Tabla 6. Variación del contenido de quercetina en las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", para determinar la precisión intermedia. Ayacucho 2016.

Día	Muestra (N°)	A	Quercetina (g)	Quercetina (%)
1	1	1,097	0,422	42,24
	2	1,095	0,421	42,08
	3	1,098	0,422	42,20
	4	1,095	0,420	42,00
	5	1,095	0,421	42,08
	6	1,096	0,421	42,12
2	1	1,096	0,421	42,12
	2	1,095	0,421	42,08
	3	1,093	0,418	41,85
	4	1,095	0,420	42,00
	5	1,094	0,418	41,81
	6	1,094	0,420	41,97
3	1	1,095	0,419	41,92
	2	1,093	0,418	41,85
	3	1,095	0,418	41,84
	4	1,096	0,419	41,88
	5	1,094	0,419	41,89
	6	1,093	0,419	41,93
			\bar{x}	41,99
			s	0,132
			%C.V.	0,315^(a)

^(a)Especificación C.V. \leq 3,0%

Tabla 7. Porcentaje de recuperación de quercetina en las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", para determinar la exactitud. Ayacucho 2016.

Muestra	Quercetina teórica (µg/mL)	A ^(a)	Quercetina real (µg/mL)	Recuperación (%)
M-1	2,412 µg/mL	0,157	2,407	99,8
		0,155	2,376	98,5
		0,156	2,391	99,1
M-2	3,216 µg/mL	0,211	3,237	100,7
		0,209	3,207	99,7
		0,211	3,237	100,7
M-3	4,02 µg/mL	0,263	4,037	100,4
		0,260	3,991	99,3
		0,262	4,022	100,1
			\bar{x}	99,8
			s	0,738
			%C.V.	0,740
			t_{exp.}	0,803^(b)
			t_{tabla}	2,306
			G.L.	8

(a) Absorbancia obtenida de la muestra enriquecida.

(b) Especificación: $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$

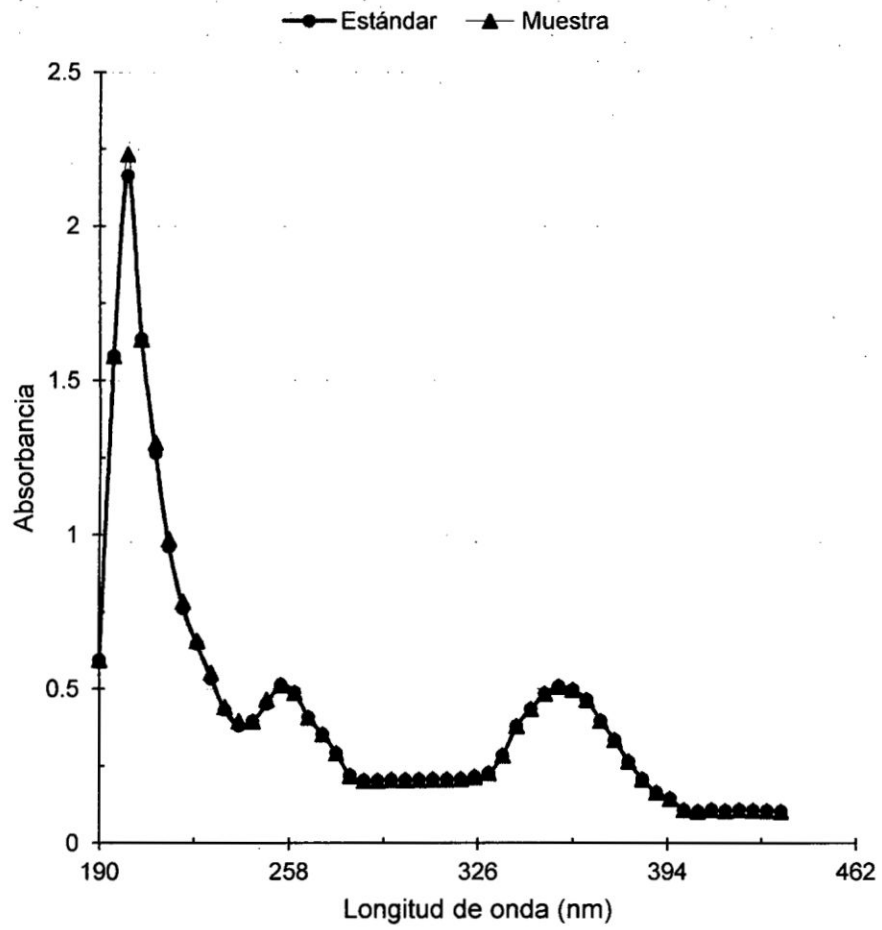


Figura 3. Espectros de absorción UV del estándar de quercetina y la muestra. Ayacucho 2016.

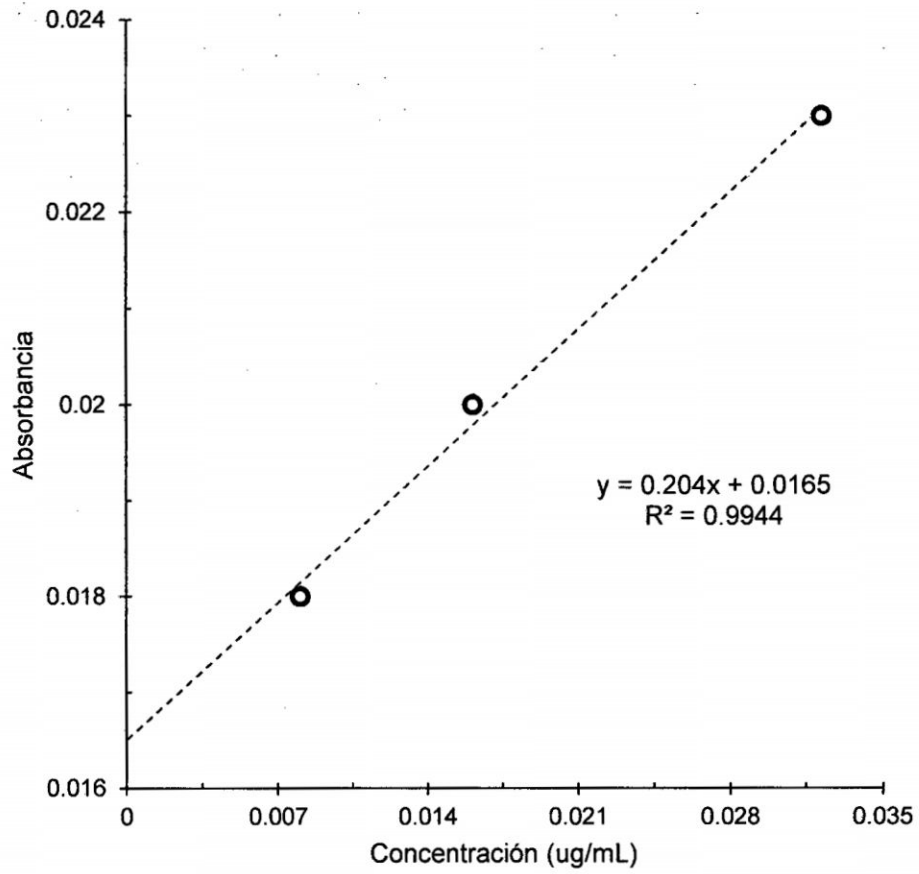


Figura 4. Variación de la absorbancia en función de la concentración de quercetina, para determinar la sensibilidad. Ayacucho 2016.

V. DISCUSIONES

El presente trabajo se basó en la validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales presentes en las hojas de *Calceolaria engleriana* kraenzl "wawillay", para la obtención del extracto se utilizó el equipo de soxhlet, esta extracción se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible el cual se encuentra dentro del método de extracción descrito por Kostennikova.²¹

La validación de un método es aquel proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas; esta capacidad se expresa en términos de parámetros de análisis, donde se tiene en cuenta la linealidad, precisión, exactitud, especificidad, sensibilidad, entre otros, en dependencia del objetivo que se persiga.

En la actualidad es gran importancia la validación de métodos, procesos, etc., que permitan mayor confiabilidad en los resultados, fundamentalmente cuando se trabaja con productos naturales, donde es necesario obtener datos y resultados experimentales que demuestren la aptitud para el uso que se destina; es por ello, que nos trazamos como objetivo la validación del método espectrofotométrico que permiten cuantificar los flavonoides totales, compuesto que según referencias bibliográficas, están relacionados con la acción farmacológica de la especie *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

Después de realizar el análisis del tamizaje fitoquímico los metabolitos secundarios identificados fueron, los fenoles y taninos con cantidades excelentes; cantidades moderadas de flavonoides, catequinas, lactonas, cumarinas y quinonas; asimismo se encontró una escasa cantidad de alcaloides tal como se muestra en la tabla 3.

El proceso de identificación se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina, donde se muestra que existe presencia de flavonoides totales como la quercetina ya que este último se utilizó como estándar, presentando en el cromatograma al observarse a la cámara UV a una longitud de onda de 365 nm manchas de la muestra y el estándar a las mismas alturas, que al determinar su R_f del estándar y muestra, se obtienen R_f muy cercanos con valores de $R_f = 0,90$ de estándar y $R_f = 0,86$ (figura 1); asimismo se puede mencionar en investigaciones diferentes que los valores de R_f obtenidos son de 0,80 según otros autores.²²

Al realizar el análisis estadístico de la linealidad, teóricamente es la capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen. En este estudio, la linealidad se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (R) y el coeficiente de determinación (R^2). R indica el grado de asociación entre dos variables (en este caso absorbancia y concentración) y R^2 , indica qué tan bueno es el modelo de regresión utilizado. Los criterios de aceptación para ambos parámetros son que R y R^2 deben ser mayores que 0,995.¹² La curva se preparó dentro del rango de cinco concentraciones que van desde 4,0 $\mu\text{g/mL}$ hasta

8,0 $\mu\text{g/mL}$ del estándar de quercetina, obteniéndose la ecuación de la curva de calibración de $y = 0,065x + 0,0088$ donde Y es la absorbancia y X la concentración del estándar y los valores de R y R^2 obtenidos fueron 0,9995 y 0,9989 respectivamente los cuales se observa en la figura 2; asimismo se realizó la prueba de t student para determinar la significancia estadística de los valores de la pendiente "b", intercepto "a" y el test de regresión en función de coeficiente de correlación, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ (95 % de confianza) y $n - 2$ grados de libertad.

En el análisis estadístico de la pendiente "b" por método de t student el criterio de aceptación que debe cumplir es que $t_{\text{exp.}} > t_{\text{tabla}}$; se obtuvieron valores del $t_{\text{exp.}}$ igual a 13,733 el cual es mayor que el t_{tabla} igual a 3,182 (anexo 4) entonces cumple con la especificación por lo tanto se acepta la hipótesis alterna donde la pendiente es estadísticamente diferente de cero; seguidamente se determinó la significancia estadística del intercepto "a" por el mismo método donde el criterio de aceptación que debe cumplir es que $t_{\text{tabla}} > t_{\text{exp.}}$ obteniéndose valores de $t_{\text{exp.}}$ igual a 0,698 y t_{tabla} igual a 3,182 el cual es mayor que 0,698 ($t_{\text{expe.}}$) (Anexo 4) con

estos resultados se acepta la hipótesis alterna donde intercepto "a" es estadísticamente igual a cero; finalmente se determinó la significancia del coeficiente de correlación R donde se obtuvo un valor de $R^2 = 0,9989$; t_{tabla} igual a 3,182 y $t_{\text{expe.}}$ igual a 52,197 el cual cumple el criterio de que $t_{\text{expe.}} > t_{\text{tabla}}$ por tanto se acepta la hipótesis nula donde R es diferente de cero (anexo 2) asimismo el valor de R^2 es mayor que 0,995, este valor obtenido es muy cercano al que obtuvo Toscano E.²³ con un R^2 de 0,9985; con estos resultados se afirma que existe correlación entre x (concentración) e y (absorbancia).

También se determinó el coeficiente de variación a partir del factor de respuesta (y/x) obteniendo un valor de 4,594 % siendo menor al 5 % del coeficiente de variación establecido y comprobando se puede afirmar que existe linealidad en el intervalo estudiado (anexo 4).

Todo lo anterior nos permite afirmar que existe una buena correlación entre la concentración y la respuesta obtenida (valores de absorbancia), lo cual demuestra linealidad en el rango de las concentraciones estudiadas. Estos resultados demuestran que el método es lineal, se muestra de esta forma que el ensayo cumple de modo apropiado con la Ley de Lambert-Beer, lo cual indica que se pueda usar la absorbancia como magnitud adecuada para determinar a partir de ella la concentración de principio activo presente en las muestras.²⁴

En el análisis estadístico para la evaluación del parámetro de precisión en función de repetibilidad y precisión intermedia del método se determinó en función de la cantidad y porcentaje de analito hallado en la muestra, obteniendo los siguientes resultados, se muestran las variaciones obtenidas en los porcentajes de analito hallado en la muestra, la media del analito hallado y la desviación estándar relativa, obtenidos intradía (repetibilidad) e interdías (precisión intermedia) que se muestran en la tabla 4 y 5 para repetibilidad y la tabla 6 para precisión intermedia. En la repetibilidad los resultados del coeficiente de variación fueron de 0,26 % y 0,19 %, con respecto a la precisión intermedia se obtuvo un coeficiente de variación de 0,315 %. Los valores de coeficiente de variación por debajo de

1,5 % en análisis de repetibilidad (intradía) y por debajo de 3 % en análisis de precisión intermedia (interdías) son considerados aceptables.¹² El cumplimiento de ambos estudios nos permiten afirmar que el método es preciso; estos mismos resultados se obtuvieron en el trabajo de estudios sobre la "validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de

taninos y flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba L.*, donde tuvieron como resultado un coeficiente de variación de 0,28 % afirmando que el método es preciso.⁶

Los valores referentes a la exactitud del método obtenidos por medio de la prueba de recuperación, se encuentran en la tabla 7. El porcentaje de analito recuperado promedio es de 99,8 % y un coeficiente de variación de 0,740 % muestran que el método presenta exactitud, estos valores obtenidos en la determinación están próximos al valor verdadero donde los porcentajes de recuperación entre 96 % - 104 % y coeficiente de variación menor del 3 % son considerados aceptables.¹² Estos resultados son cercanos a los obtenidos en otras investigaciones, según Travieso M, et al.²⁵ los valores obtenidos de recuperación fueron de 100,742 % al igual que Gutiérrez Y.⁶ obtuvo un 97,44 % de recuperación.

Asimismo se determinó la significancia estadística de la exactitud por el método de t-student para un nivel de confianza de $\alpha = 0,05$ (95 % de confianza) y n-2 grados de libertad y especificación que debe cumplir donde $t_{exp} < t_{tabla}$, al procesar los resultados se obtuvo un t_{exp} de 0,803 y t_{tabla} de 2,306; los cuales cumplen con dicha especificación. Por lo tanto con estos resultados de coeficiente de variación, recuperación promedio y el t-student se concluye que el método es exacto.

En el parámetro de especificidad o selectividad los resultados que se obtuvieron fueron de $0,0007 \pm 0,0002$ los cuales indican que el placebo no absorbió significativamente en la longitud de onda de trabajo. También se comparó los espectros de absorción del estándar desde los 200 nm hasta los 500 nm el cual se encuentra ilustrado en la figura 3, y nos muestran mismos espectros de absorción tanto del estándar como de la muestra.

La sensibilidad de un método analítico, se define como la pendiente "m" de la curva de calibración, ya que esta define la razón de cambio de la propiedad medida por unidad de concentración. Una respuesta no lineal en la gráfica de Absorbancia vs Concentración indica un cambio en el valor de la sensibilidad en función de la concentración. Conforme la concentración del analito se aproxima a cero, la señal desaparece dentro del ruido y se rebasa el límite de detección. La sensibilidad aunque es independiente de la concentración, se obtiene como el cociente de dividir la señal medida (absorbancia) entre su valor ($m = s/c$), y por lo que se puede observar es simplemente igual a la pendiente promedio.¹²

Se puede observar los resultados de las absorbancias y concentraciones en la figura 4, se prepararon tres concentraciones del estándar a concentraciones bajas las cuales fueron 0,008; 0,016 y 0,032 µg/ml, con estos datos se realizó la curva de regresión lineal para obtener la ecuación de la recta $y = 0,204x + 0,017$ y R^2 igual a 0,9944; con estos datos se procederá a calcular el límite de detección y el límite de cuantificación.

El resultado obtenido para el límite de detección de acuerdo al procedimiento recomendado, fue de 0,003 µg/mL de analito; los valores de límite de cuantificación obtenidos fueron de 0,0072 µg/mL de analito los cuales se pueden observar en el anexo 6.

En cuanto a los resultados de la cuantificación de flavonoides totales por el método descrito por Kostennikova²¹ presentes en la muestra donde se presentan los resultados en la tabla 7, en función del porcentaje de quercetina encontrado en la muestra es de $42,0 \pm 0,12$ % es decir existe 42 gramos de quercetina por 100 gramos de muestra, asimismo Ortega A.²⁶ en su trabajo de investigación sobre la determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chía presentan un 60,49 % de quercetina; la cuantificación de flavonoides expresado como porcentaje de quercetina descrita por Mota J.²⁷ quien reportó concentraciones de flavonoides en extracto metanólico de chía con valores cinco veces menores de 60,49 %. En el trabajo de investigación realizado por Ruiz S.ed at²⁸ reporta 0,48 % de quercetina; asimismo en otra investigación se reportó el contenido de flavonoides totales en propoleo con un 11,45 % de quercetina.²⁹

En un trabajo de investigación sobre Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante, concluye con la presencia de un 15 % de quercetina hallado en las muestras de té.³⁰

Estas diferencias pueden deberse a numerosos factores como la ecología de la flora, periodo de colecta, región de la colecta, exposición a la luz del extracto y el solvente que se utiliza, los cuales pueden afectar el contenido de flavonoides debido a que se oxidan fácilmente.³¹

Todo el estudio desarrollado nos permite afirmar que el método espectrofotométrico propuesto para la cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina, validados para el control químico de calidad de la droga cruda de *Calceolora engleriana* Kraenzl, son fiables, pues demuestran

mantener los criterios fundamentales de linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud y especificidad.

VI. CONCLUSIONES

1. El método analítico para la cuantificación de flavonoides totales en *Calceolaria engleriana* Kraenzl por espectrofotometría UV cumple con los criterios de validación establecidos.
2. Los metabolitos secundarios identificados en la droga cruda de *Calceolaria engleriana* Kraenzl fueron azúcares reductores, catequinas, flavonoides, fenoles, taninos, quinonas, triterpenos y esteroides.
3. Se determinó el Rf del estándar de quercetina y Rf de la muestra obteniéndose valores de 0,9 y 0,86 respectivamente.
4. El método es lineal en el intervalo de concentraciones de 0,8 a 4,0 µg/mL del estándar, es preciso porque se obtienen resultados repetitivos (CV<3 %); es exacto ya que permite la recuperación de casi la totalidad del analito (recuperación media: 99,8 %); es específica ya que el placebo o solución blanco no presenta valores de absorbancia significativos (absorbancia: 0,0007) y es sensible ya que permite detectar y cuantificar concentraciones mínimas del estándar (límite de detección: 0,003 µg/mL y límite de cuantificación: 0,007 µg/mL), para las condiciones de trabajo establecidas en el método.

VII. RECOMENDACIONES

1. Trabajar con equipos e instrumentos verificados y calibrados para que el estudio tenga un respaldo de veracidad de los resultados.
2. Realizar el mantenimiento periódico de los equipos.
3. Determinar mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los diferentes tipos de compuestos fenólicos presentes en *Calceolaria engleriana* kraenzl "wawillay".
4. Determinar la óptima extracción de los flavonoides totales presentes en la *Calceolaria engleriana* kraenzl "wawillay" utilizando diferentes solventes para obtener las cantidades máximas de metabolito.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. Plantas Medicinales de Uso en Chile. Química y Farmacología. Chile. Editorial Universal. 2001. p.15–16.
2. Castillo P. y Ramírez L. Estudio fitoquímico de *Clerodendrum frogans* utilizando solventes de diferente polaridad por maceración comparada con alcohol de 70° por lixiviación. [tesis de licenciatura] Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 1994. p.2.
3. Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* Vol. 22(1):48-57.
4. Shap J. Quality in manufacture of medicines and other healthcare products. Part 5: Quality control. London: Pharmaceutical Press; 2000. p. 283-358.
5. Molau, U. 2003. Two new species of *Calceolaria* (Scrophulariaceae) from the Tropical Andes. *Novon* 13: 101-103.
6. Gutiérrez Y, Miranda M, Varona N, Rodríguez A. Validación de 2 Métodos Espectrofotométricos para la cuantificación de Taninos y Flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba* L. *Rev Cubana Farmacia*; Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. [Revista en internet]. 2000 [acceso 08 de diciembre de 2015]; 34(1): 50-55. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v34n1/far07100.pdf>.
7. Silvestre Y, Monteiro R, Figueriredo W, Marques L. Validación de procedimientos para la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales en hojas de *Bauhinia forficata* Link. *Química Nova*; Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Universidad Federal de Pernambuco. [Revista en internet]. 2011 [acceso 15 de junio de 2016]; 35(3): 517-522. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v35n3/14.pdf>
8. Silvestre G. Desenvolvimiento y validación de métodos analíticos para cuantificación de flavonoides totales y canferitrina en hojas de *Bauhinia forficata* Link [tesis de pos-grado]. Pernambuco. Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Universidad Federal de Pernambuco. 2011.
9. De la Rosa C, Torres C, Camacho O, Calderón Z. Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de *Glycyne max* (soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. *Revista Colombiana de Ciencias de la Salud*; Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico [Revista en internet]. 2012 [acceso 15 de junio de 2016]; 1(1). Disponible en: https://investigaciones.uniatlantico.edu.co/sipvua/media/PDF/R_Col_C_S/articulo6.pdf
10. Venegas E. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Revista UCV-Scientia*; Universidad Nacional de Trujillo. [Revista en internet]. 2012 [acceso 15 de junio de 2016]; 4(2). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4369412.pdf>
11. Soto M. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región de amazonas. In *Crescendo*. Institucional; Universidad Nacional de Trujillo. [Revista en internet]. 2015 [acceso 15 de junio de 2016]; 6(1): 33-43. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5127582>
12. AEFI. Asociación Española de Farmacias de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. 2001.
13. USP 35-NF 30. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Volumen 1. 2012.

14. Quattrocchi O, Abelaira de Andrzi, S.A. and Laba, R.F. Introducción a HPLC. Aplicación y práctica. Ed Artes Gráficas Farro. Buenos Aires, Argentina. 1992. Pp: 47, 90, 91, 106, 112-122, 302- 327. disponible en: cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fcl177i/doc/fcl177i.pdf
15. Molau U. 1988. Scrophulariaceae. Part I. Calceolarieae. Fl. Neotrop. Monogr. 47: 1-326. en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172799332010000200003&script=sci_arttext&tlng=es
16. Castillo L. Tamizaje fitoquímico y determinación de la actividad hipoglucemiante y toxicidad aguda del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria Deliculata engleriana* Subsp.lutea Molau. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico]. Ayacucho, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2001.
17. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. 1ª edición. Perú. Fondo Editorial Pontífice Universidad Católica del Perú. 1988.
18. Romero M, Cesar M, Enrique A. Aspectos Botánicos, Fitoquímico, Antibacteriano y producción del Genero *Calceolaria* en la provincia de Huamanga-Ayacucho. [Tesis para optar título de biólogo] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2009.
19. Miranda M, Cuéllar A. (1992). Manual de prácticas de laboratorio farmacognosia y productos naturales. Cuba: Editorial Ciencia y Educación.
20. Pharmacopeia brasileira. 2010. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria ANVISA, volumen 1, 5º edición. Brasil. Disponible en: www.anvisa.gov.br/hotsite/cd.../pdf/volume1%2020110216.pdf
21. Kostennikova Z. UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. Farmatsiya 1983; 33(6):83-6.
22. Toso E. y Skliar M. Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Compuestos con Actividad Gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.Pam. – 2002. Disponible en: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n04a03toso.pdf>.
23. Toscano E, Loja B. y Garrido P. Cuantificación de flavonoides totales en una bebida mixta de quinua, kañiwa y kiwicha. Instituto de Investigación, Medicina Tradicional y Farmacología, Bioquímica y Nutrición. Universidad de San Martín de Porres. [Revista en internet]. 2014 [acceso 15 de junio de 2016]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/260676189>.
24. Massart DL, Verbeke JS. An introduction to method validation. Analisis Magazine. [Revista en internet]. 1994 [acceso 15 de junio de 2016]; 2(5). Disponible en: <http://Method%20validation%20and%20development.pdf>.
25. Travieso M, et al. Validación del método de cuantificación de taninos totales en formulaciones semisólidas de *rhizophora mangle* L. (mangle rojo). Rev Cubana de plantas Medicinales. [Revista en internet]. 2011 [acceso 08 de julio de 2016]; 16(1): 83-93. Disponible en: [http:// http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla09111.pdf](http://http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla09111.pdf).
26. Ortega A, López A. y González B. Determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chía (*salvia hispánica* L.) Revista de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. . [Revista en internet]. 2016 [acceso 08 de julio de 2016]; 1(2): 424-429. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/4/73.pdf>
27. Mota J. Determinación del efecto vasorelajador del extracto metanólico de *Salvia hispánica* L. en anillos aislados de aorta en ratas. [Tesis de

- licenciatura]. Monterrey: Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2012.
28. Ruiz S. et al. Capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *sambucus peruviana* h.b.k. (sauco) proveniente de la ciudad de Huamachuco. Revista farmacociencia. [Revista en internet]. 2013 [acceso 15 de junio de 2016]; 1(2). Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/464/419>
 29. Alves E, Hashime E. contenido de fenoles, flavonoides totales y actividad antioxidante de la muestra de propolis comercial. Revista de Ciencias Farmacéuticas Básica y Aplicada. [Revista en internet]. 2009 [acceso 04 de julio de 2016]; 16(3): 388-395. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a13.pdf>
 30. Venegas E. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. Revista UCV –scientia. [Revista en internet]. 2012 [acceso 04 de julio de 2016]; 4(2). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4369412.pdf>
 31. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Society for Clinical Nutrition [Revista en internet]. 2004, 79(1):727-47. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113710

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de la especie *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2016.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Raúl Nemecló, **CORONADO BENDEZÚ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SCROPHULARIALES
FAMILIA	:	SCROPHULARIACEAE
GENERO	:	Calceolaria
ESPECIE	:	<i>Calceolaria engleriana. Kraenzl.</i>
N.V.	:	"wawillay"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 14 de Junio del 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Dra. Laura Rosalva Sánchez
JEFE

Anexo 2. Concentración y absorbancia requerida para la curva de calibración del estándar de quercetina. Ayacucho 2016.

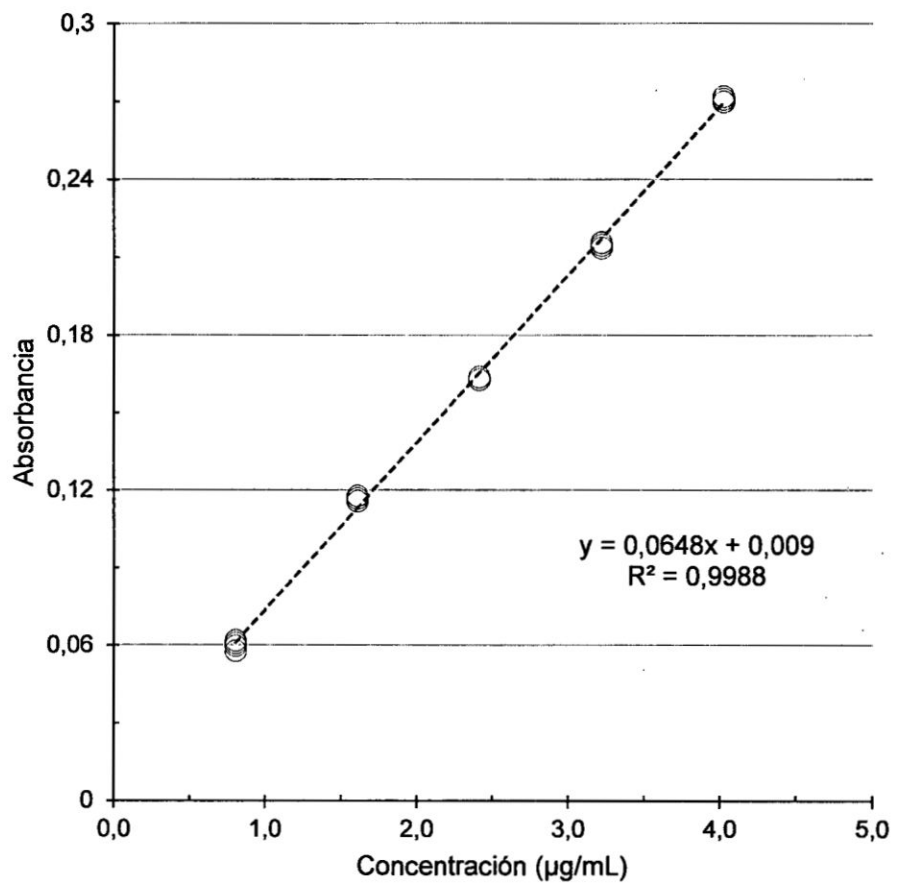
Repeticiones (N°)	Quercetina (ug/mL)	A ^(a)	\bar{x}
1		0,061	
2	0,804	0,058	0,059
3		0,059	
1		0,117	
2	1,608	0,118	0,117
3		0,117	
1		0,164	
2	2,412	0,164	0,164
3		0,163	
1		0,216	
2	3,216	0,215	0,216
3		0,216	
1		0,272	
2	4,02	0,271	0,271
3		0,271	

^(a) Absorbancia.

Test de hipótesis para "r"

t experimental	52,197
t tabla	3,182
Grados de libertad (n-2)	13
Especificación	$t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$

Anexo 3. Dispersión de las tres curvas matrices de la solución estándar de quercetina. Ayacucho 2016.



Anexo 4. Variabilidad de los factores de respuesta de la solución estándar de quercetina. Ayacucho 2016.

Repeticiones (N°)	Quercetina (ug/mL)(x)	A ^(a) (y)	X.Y	X ²	Y ²	F ^(b) (X/Y)
1	0,804	0,059	0,048	0,646	0,004	13,551
2	1,608	0,117	0,189	2,586	0,014	13,705
3	2,412	0,164	0,395	5,818	0,027	14,737
4	3,216	0,216	0,694	10,343	0,047	14,912
5	4,02	0,271	1,091	16,160	0,074	14,816
Σ	12,06	0,827	2,415	35,553	0,164	71,720
					\bar{x}	14,344
					D.E	0,659
					%C.V	4,594

^(a) Absorbancia promedio.

^(b) Factor de respuesta.

Promedio de Factor	14,344
Desviación estándar de F	0,654
Coefficiente de variación de F	4,594%
Especificación:	CV ≤ 5%

Significancia estadística de la pendiente "b"

límite de confianza	0,050 - 0,080
t experimental	13,733
t tabla	3,182
Grados de libertad (n-2)	3
Especificación	$t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$

Significancia estadística del intercepto "a"

límite de confianza	0,031 - 0,049
t experimental	0,698
t tabla	3,182
Grados de libertad (n-2)	3
Especificación	$t_{\text{tabla}} > t_{\text{experimental}}$

Anexo 5. Variación de la absorbancia de quercetina a concentraciones menores, para determinar la sensibilidad. Ayacucho 2016.

Quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	$A^{(a)}$	$A^{(a)}$ blanco
0,00804	0,018	0,0007
	0,018	0,0009
	0,018	0,0005
0,0161	0,021	0,0009
	0,021	0,0006
	0,021	0,0007
0,0322	0,023	0,0007
	0,023	0,0009
	0,023	0,0007
	\bar{x}	0,00073
	D.E.	0,00014

^(a) Absorbancia.

Anexo 6. Obtención del valor de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Ayacucho 2016.

Señal analítica mínima distinguible	$S_m = S_{bl} + K S_{BL}$	$S_m = 0,0007 + 3 \cdot 0,00014 = 0,0011(\text{LD})$
		$S_m = 0,0007 + 10 \cdot 0,00014 = 0,0021(\text{LC})$
LD	$(S_m - S_{bl})/m$	$(0,0011 - 0,0007)/0,204 = 0,003\mu\text{g/mL}$
LC	$(S_m - S_{bl})/m$	$(0,0021 - 0,0007)/0,204 = 0,0072\mu\text{g/mL}$

Anexo 7. Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	VARIABLES	METODOLOGIA
Validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales en <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl por espectrofotometría UV?	¿Será posible validar el método analítico para la cuantificación de flavonoides totales en <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl por espectrofotometría UV?	<p>Objetivo general:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Validar el método analítico para la cuantificación de flavonoides totales en <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl por espectrofotometría UV. <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Identificar la presencia de flavonoides totales en la droga cruda de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". -Determinar el factor de retención del estándar de quercetina y la muestra mediante cromatografía de capa fina. -Determinar la linealidad, exactitud, selectividad y sensibilidad del método analítico por espectrofotometría UV. 	<p>Validación de métodos analíticos</p> <p>La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo, robustez.¹³</p> <p>La cromatografía es un método analítico empleado ampliamente en la separación, identificación y determinación de componentes químicos en mezclas complejas.¹³</p> <p>El género Calceolaria L. es el más numeroso de la familia Calceolariaceae contando con aproximadamente 250 especies.¹⁵</p> <p>Se realizaron el tamizaje fitoquímico de la especie <i>Calceolaria engleriana</i> donde se demostró la presencia de compuestos fenólicos como: taninos, flavonoides y catequinas; los terpenoides como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y/o esteroides y las quinonas.¹⁶</p> <p>Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propanícos, es decir, su estructura es del tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno.¹⁷</p>	<p>Variables</p> <p>Validación</p> <p>Indicadores:</p> <p>Exactitud Precisión Selectividad Sensibilidad Linealidad</p>	<p>Tipo de investigación: básico</p> <p>Nivel de investigación: descriptivo</p> <p>Población: hojas de "wawillay" del departamento de Ayacucho.</p> <p>Muestra: 1 kilo de hojas secas de "wawillay".</p> <p>Extracción de la muestra: se procederá al secado de las hojas de "wawillay" en un lugar ventilado, para luego ser molido, con la cual se trabajará.</p> <p>Tamizaje fitoquímico: se obtiene una cantidad de la droga vegetal para luego someterla a la reacción de diferentes reactivos los cuales la coloración y precipitación nos indican la presencia de metabolitos secundarios.</p> <p>Identificación</p> <p>Método en cromatografía de capa fina:²⁰</p> <p>Soporte: sílica-gel G.</p> <p>Fase estacionaria: acetato de etilo, agua y ácido fórmico anhídrido (80:10:10).</p> <p>Fase móvil: aplicar, separadamente, en la placa, en forma de banda, 10 µL de solución muestra y 5 µL de la Solución std, recientemente preparadas.</p> <p>Revelar: Examinar sobre luz ultravioleta (365 nm). Las manchas obtenidas del estándar y la muestra.</p> <p>Cuantificación de flavonoides por Espectrofotometría UV.</p> <p>Método descrito por Kostennicova:²¹</p> <p>Longitud de onda : 258 nm</p> <p>Muestra: tal como indica en el diseño metodológico.</p> <p>Estándar: quercetina 8 µg/mL</p> <p>Parámetros a evaluar:</p> <p>Linealidad.- se tomaran seis concentraciones del estándar y se leerán por triplicado cada concentración.</p> <p>Precisión.- se determinará con respecto a la mayor concentración la variabilidad de las absorbancias.</p> <p>Exactitud.- mediante el porcentaje de recuperación de cada una de las concentraciones.</p> <p>Especificidad.- mediante la adición del patrón y el placebo.</p> <p>Sensibilidad.- medir la absorbancia de una concentración menor del estándar por triplicado.</p> <p>Análisis estadístico:</p> <p>Los datos serán procesados de acuerdo a las especificaciones de cada parámetro de validación utilizando los paquetes estadísticos.</p>

“Validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales en *Calceolaria engleriana* Kraenzl wawillay”

Autor: Bach. Raúl Nemecio Coronado Bendezú

Asesor: Mg. Q.F. Marco Rolando Aronés Jara

RESUMEN

La validación de un método es aquel proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas; esta capacidad se expresa en términos de linealidad, precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad. La presente investigación es de tipo básico descriptivo que tiene como objetivo validar el método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales en las hojas de *Calceolaria engleriana* kraenzl “wawillay”, expresados como quercetina. Las muestras fueron recolectadas de la comunidad de Huaraca, anexo de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Para validar la metodología se prepararon soluciones a diferentes concentraciones tanto de la muestra como del estándar para después evaluar los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. Se demostró la linealidad del estándar con la ecuación de la recta, con coeficientes de determinación y correlación (r^2 y r) mayores de 0,995; precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia con resultados de coeficiente de variación 0,260 % y 0,315 % respectivamente; exactitud 99,802 % de recuperación; límite de detección y límite de cuantificación de 0,003 y 0,004 ug/mL de quercetina respectivamente. La aplicabilidad del método validado se evaluó en la droga vegetal “wawillay”, obteniéndose una concentración de 41,99±0,15 % de quercetina. Se concluyó que el método es válido.

Palabras claves: validación, método analítico, quercetina, espectrofotometría.

"Validation of analytical method by UV spectrophotometry for quantitation of total flavonoids in *engleriana Calceolaria* Kraenzl wawillay"

SUMMARY

The validation of a method is the process by which it is established by laboratory studies that capacity meets the requirements for the intended applications; This capacity is expressed in terms of linearity, precision, accuracy, specificity and sensitivity. This research is descriptive basic type which aims to validate the analytical method by UV spectrophotometry for quantitation of total flavonoids in leaves *Calceolaria engleriana* kraenzl "wawillay", expressed as quercetin. Samples were collected from the community Huaraca, annex Vinchos province of Huamanga, Ayacucho department. To validate the methodology solutions at different concentrations of both sample and standard for evaluating parameters after linearity, precision, accuracy and sensitivity were prepared. linearity standard demonstrated by the equation of the line, with coefficients of determination and correlation (r^2 and r) greater than 0.995; precision under repeatability and intermediate precision results coefficient of variation 0.260 % and 0.315 % respectively; 99.802 % accuracy recovery; detection limit and limit of quantification 0.003 and 0.004 ug/mL of quercetin respectively. The applicability of the validated method was evaluated in the plant drug "wawillay", resulting in a concentration of 41.99±0.15 % quercetin. It was concluded that the method is valid.

Keywords: validation, analytical method, quercetin, spectrophotometry.

Correspondencia:

Raúl Nemecio Coronado Bendezú: Raulin_781_3@hotmail.com

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Éste saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos; para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo.¹

Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes ampliamente en la naturaleza, son responsables del buen funcionamiento de las plantas y sus beneficios para la salud humana han sido bien reconocidos en varios estudios, uno de estos es su conocida capacidad antioxidante, llegándose a utilizar los flavonoides para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares.²

La validación es uno de los elementos básicos en sistemas de calidad. El hecho de validar trata de disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato generado, a través de la realización de un trabajo analítico dentro de unos parámetros definidos. La validación de un método analítico provoca una mayor fiabilidad y aceptación de los datos generados. Entre los parámetros analíticos más utilizados se encuentran: exactitud, sesgo, precisión, linealidad, repetibilidad, límite de detección y de cuantificación, sensibilidad, entre otros.³

La especie *Calceolaria engleriana* Kraenzl, comúnmente conocida como “wawillay”, es una planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae. Se sabe que la distribución de *Calceolaria* va del sur de la Sierra Madre Occidental en México, hasta los Andes del sur, la mayoría de las especies están en alturas que oscilan los 2 000 a 4 000 m.s.n.m.⁴

Teniendo en cuenta el amplio uso del “wawillay” para tratamientos, prevenciones y curaciones de enfermedades y el factor de no disponer de un método de referencia descrito en farmacopeas se hace necesario disponer de métodos validados confiables de cuantificación de la sustancia activa como es la quercetina utilizando el espectrofotómetro UV-Vis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

1 kg de hojas desecadas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl, que fueron recolectadas durante el mes de marzo.

Tamizaje fitoquímico

Se realizarán según procedimientos descritos por Miranda y Cuéllar.⁵

Identificación de flavonoides totales por el método cromatográfico

Se llevará a cabo por el método de cromatografía en capa fina descrita en la Farmacopea Brasileña.²⁰

Las condiciones cromatografías fueron:

Fase estacionaria: sílica-gel G.

Fase móvil: acetato de etilo, agua y ácido fórmico anhidro (80:10:10)

Procedimiento: se aplica, separadamente, en la placa, en forma de banda, 10 µL de Solución (1) y 5 µL de la Solución (2), recientemente preparadas.

Solución (1): agitar, en ultrasonido, durante 10 minutos, una dispersión de 50 mg/mL del extracto en etanol y agua (1:1). Filtrar.

Solución (2): solución de 100 µg/mL de estándar en una mistura de etanol y agua (1:1).

Revelar: se examina sobre luz ultravioleta (365 nm). Las manchas obtenidas con la Solución (1) y la Solución (2).

Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría UV

Para la cuantificación de flavonoides totales se utilizará el método descrito por Kostennikova.⁷

a) Preparación de la muestra

Se reflujan 0,5 g de muestra dos horas con 20 mL de ácido sulfúrico al 10 % y 20 mL de etanol al 50 %, luego se enfría y se filtra con ayuda de vacío. El residuo se lava con 30 mL de etanol al 50 %; para desecharlo finalmente. El filtrado se evapora en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial, se enfría sobre baño de hielo durante 30 minutos y luego se filtra, se lava el precipitado formado con cuatro porciones de 10 mL de agua destilada fría (10-15°C). Se elimina el filtrado, los lavados, y el residuo tanto del filtro como del recipiente, se disuelve con 70 mL de etanol al 96 %, calentando previamente a 50°C; y finalmente la solución se trasvasa a una fiola de 100 mL y se completa el volumen con etanol al 96 %.

b) Preparación del estándar

Se pesará 0,04 g de quercetina, los cuales se disuelven con etanol al 96 % hasta completar un volumen de 50 mL; de esta solución se toma 1 mL y se diluye a 100 mL con etanol al

Correspondencia:

Raúl Nemecio Coronado Bendejú: Raulin_781_3@hotmail.com

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n

50 %. Concentración aproximada 8,0 µg/mL (solución stock).

e) Blanco

El blanco consistirá en una solución de ácido sulfúrico al 10 % y etanol al 50 %; éste, la muestra y el estándar se leen a una longitud de onda de 258 nm.

Determinación del porcentaje de quercetina

$$x = \frac{A_m \times Pr \times 5}{A_r} \times 100$$

Donde:

X: contenido de flavonoides expresados como quercetina (%).

A_m: absorbancia de la solución muestra.

Pr: peso de la sustancia de referencia en gramos.

A_r: absorbancia de la solución de referencia.

Desarrollo de los parámetros de validación

Linealidad

Se evalúa la linealidad del sistema en el cual se preparan cinco soluciones estándar a partir de la solución stock correspondiente a 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 y

4,0 µg/mL se leerá tres réplicas de cada concentración. Luego se determina la recta de regresión lineal, el valor de: coeficiente de correlación (R), coeficiente de determinación (R²), pendiente (b) y el intercepto (a).

3.4.5.2.2. Precisión

Repetibilidad: se evalúa seis absorbancias de la solución estándar a la concentración de 4,0 µg/mL. Por el mismo analista, mismo día, mismo instrumento. Luego se determina la media y el coeficiente de variación.

Precisión intermedia: las muestras y los estándares se preparan de acuerdo a la metodología, en tres etapas y en diferentes sesiones. Día 1, 2 y 3: seis lecturas de las muestras al 100 % y estándar (solución stock). Luego se determina la media y el coeficiente de variación.

3.4.5.2.3. Exactitud

Se evalúa en función de porcentaje de recuperación mediante el método de enriquecimiento de la muestra con alícuotas de estándar. Para tal procedimiento se trabaja con tres concentraciones de 2,4; 3,2 y 4,0 µg/mL de quercetina. Se determina el porcentaje de recuperación utilizando la ecuación de la recta asimismo se determina la media, coeficiente de variación, t_{expe.} y t_{tabla.}

3.4.5.2.4. Selectividad o especificidad

Se evalúa las absorbancias de nueve repeticiones de la solución blanco o placebo, asimismo se determina el espectro de absorción UV del estándar y muestra. Luego se evalúa la desviación estándar del blanco y el recorrido

del espectro de absorción del estándar y la muestra.

3.4.5.2.5. Sensibilidad

Se determinará por el método instrumental por comparación de blanco con blanco enriquecido a diferentes concentraciones. Se preparan el blanco enriquecido a diferentes concentraciones bajas de 0,008; 0,016; 0,032 µg/mL con una lectura de triplicado de cada concentración y el blanco solo. Luego se construye la regresión lineal de los blancos enriquecidos para determinar la pendiente, también se calcula el valor promedio de la señal del blanco y su desviación estándar. Con todos estos datos se determina el límite de detección y límite de cuantificación.

Análisis de datos

Linealidad

El estudio de linealidad implica una representación gráfica y necesariamente una comprobación estadística.

Ecuación de la recta:

$$Y = bX + a$$

Donde:

X: la concentración del analito.

Y: valor de las respuestas del analito.

b: valor de la pendiente de la recta.

a: valor del intercepto de la recta con el eje Y.

a) Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación “r”

Criterios de aceptación: “r” debe ser significativamente diferente de cero. Si el valor de t_{experimental} obtenido es mayor que el t_{tabla} para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % (significancia α = 0,05), entonces existe correlación entre X e Y.

b) significancia estadística de la pendiente “b”

Criterios de aceptación: “b” debe ser significativamente diferente de cero. Si el valor de t_{experimental} obtenido es mayor que el t_{tabla} para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % (significancia α = 0,05), entonces b es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula.

c) significancia estadística del intercepto “a”

Criterios de aceptación: el valor de t_{experimental} obtenido es menor que el t_{tabla} para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % (significancia α = 0,05), entonces “a” no es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula.

Precisión

Correspondencia:

Raúl Nemecio Coronado Bendezú: Raulin_781_3@hotmail.com

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV).

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:

S: desviación estándar.

\bar{X} : media aritmética de los resultados.

Exactitud

Se determina por el método de porcentaje de recuperación

$$\%R = \frac{\bar{X}}{X} \times 100$$

Donde:

\bar{X} : Absorbancia obtenida por la muestra enriquecida.

X: Absorbancia obtenida por el estándar.

Test de t student

Los valores de $t_{\text{experimental}}$ y el tabulado se comparan para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad y nivel de confianza de $\alpha = 0,05$. Si $t_{\text{exp.}} < t_{\text{tabla}}$, no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación y la exactitud es apropiada.

Sensibilidad

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se obtienen de la siguiente manera:

$$S_m = S_{bl} - KS_{de}$$

$$LD = \frac{S_m - S_{bl}}{m}$$

$$LC = \frac{S_m - S_{bl}}{m}$$

S_m : señal analítica mínima distinguible.

S_{bl} : señal media del blanco.

S_{de} : desviación estándar del blanco.

m: pendiente de la curva.

K: valor establecidos (3 para LD y 10 para LC).

RESULTADOS

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de la droga cruda de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”. Ayacucho 2016.

Metabolitos secundarios	Reactivos y/o reacciones	Resultados	Observaciones
Fenoles y/o taninos	Tricloruro férrico	+++	Coloración verde intenso
Flavonoides	Shinoda	++	Coloración amarillo en la fase amilica
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma
Catequinas	Catequinas	++	Fluorescencia verde carmelita al UV
Alcaloides	Dragendorff	+	Opalescencia ligera
	Wagner	-	Incoloro
	Mayer	+	Opalescencia ligera
Azucres reductores	Fehling	+++	Precipitado rojo
Quinonas	Borntrager	++	Presencia de color rosado

Leyenda:

Ausente : (-)
 Escasa : (+)
 Buena : (++)
 Excelente : (+++)

Correspondencia:

Raúl Nemeccio Coronado Bendezú: Raulin_781_3@hotmail.com

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n



Figura 1. Cromatografía en capa fina del estándar de quercetina comparada con la muestra. Ayacucho 2016.

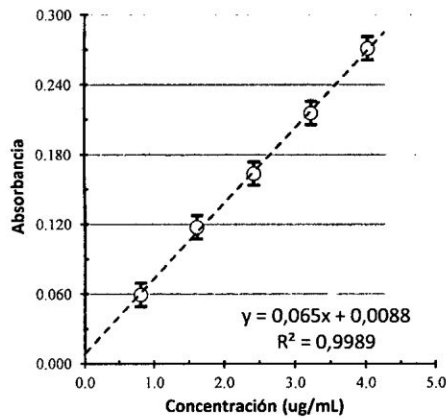


Figura 2. Variación de la absorbancia en función de la concentración de quercetina, para el test de linealidad. Ayacucho 2016.

Tabla 4. Variación de la medición de absorbancia de la solución estándar de quercetina 4 µg/mL, para determinar la precisión. Ayacucho 2016.

Muestras (N°)	Absorbancia
1	0,272
2	0,272
3	0,271
4	0,271
5	0,270
6	0,271
7	0,271
8	0,270
9	0,271
\bar{x}	0,271
s	0,00071
%C.V.	0,26 ^(a)

^(a)Especificación CV ≤ 1,5%

Tabla 5. Variación del contenido de quercetina en hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, para determinar la repetibilidad. Ayacucho 2016.

Muestra (N°)	A	Quercetina (g)	Quercetina (%)
1	1,097	0,422	42,20
2	1,095	0,421	42,10
3	1,098	0,422	42,20
4	1,095	0,420	42,00
5	1,095	0,421	42,10
6	1,096	0,421	42,10
		\bar{x}	42,12
		s	0,08
		%C.V.	0,190 ^(a)

Tabla 6. Variación del contenido de quercetina en las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, para determinar la precisión intermedia. Ayacucho 2016.

Día	Muestra (N°)	A	Quercetina (g)	Quercetina (%)
1	1	1,097	0,422	42,24
	2	1,095	0,421	42,08
	3	1,098	0,422	42,20
	4	1,095	0,420	42,00
	5	1,095	0,421	42,08
	6	1,096	0,421	42,12
2	1	1,096	0,421	42,12
	2	1,095	0,421	42,08
	3	1,093	0,418	41,85
	4	1,095	0,420	42,00
	5	1,094	0,418	41,81
	6	1,094	0,420	41,97
3	1	1,095	0,419	41,92
	2	1,093	0,418	41,85
	3	1,095	0,418	41,84
	4	1,096	0,419	41,88
	5	1,094	0,419	41,89
	6	1,093	0,419	41,93
			\bar{x}	41,99
			s	0,132
			%C.V.	0,315 ^(a)
^(b) Especificación		C.V.	≤	3,0%

Tabla 7. Porcentaje de recuperación de quercetina en las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, para determinar la exactitud. Ayacucho 2016.

Muestra	Quercetina teórica (µg/mL)	A ^(a)	Quercetina real (µg/mL)	Recuperación (%)
M-1	2,412 µg/mL	0,157	2,407	99,8
		0,155	2,376	98,5
		0,156	2,391	99,1
M-2	3,216 µg/mL	0,211	3,237	100,7
		0,209	3,207	99,7
		0,211	3,237	100,7
M-3	4,02 µg/mL	0,263	4,037	100,4
		0,260	3,991	99,3
		0,262	4,022	100,1
			\bar{x}	99,8
			s	0,738
			%C.V.	0,740
			t _{exp.}	0,803 ^(b)
			t _{tabla}	2,306
			G.L.	8

(a) Absorbancia obtenida de la muestra enriquecida.

(b) Especificación: t_{experimental} < t_{tabla}

Correspondencia:

Raúl Nemesio Coronado Bendezú: Raulin_781_3@hotmail.com

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n

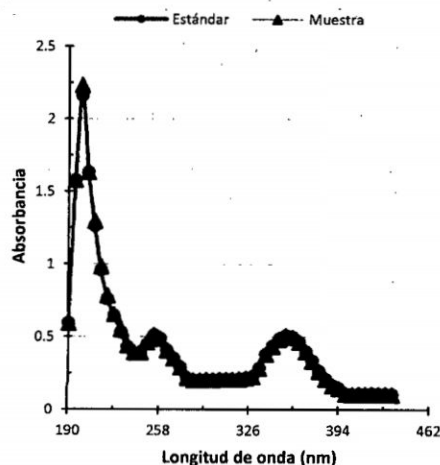


Figura 3. Espectros de absorción UV del estándar de quercetina y la muestra. Ayacucho 2016.

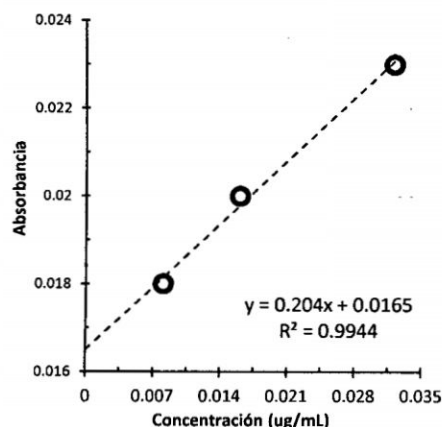


Figura 4. Variación de la absorbancia en función de la concentración de quercetina, para determinar la sensibilidad. Ayacucho 2016.

DISCUSIÓN

El presente trabajo se basó en la validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales presentes en las hojas de *Calceolaria engleriana* kraenzl “wawillay”, para la obtención del extracto se utilizó el equipo de soxhlet, esta extracción se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible el cual se encuentra dentro del método de extracción descrito por Kostennikova.⁷

La validación de un método es aquel proceso por el cual se establece mediante estudios de

laboratorio que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas; esta capacidad se expresa en términos de parámetros de análisis, donde se tiene en cuenta la linealidad, precisión, exactitud, especificidad, sensibilidad, entre otros, en dependencia del objetivo que se persiga.

En la actualidad es gran importancia la validación de métodos, procesos, etc., que permitan mayor confiabilidad en los resultados, fundamentalmente cuando se trabaja con productos naturales, donde es necesario obtener datos y resultados experimentales que demuestren la aptitud para el uso que se destina; es por ello, que nos trazamos como objetivo la validación del método espectrofotométrico que permiten cuantificar los flavonoides totales, compuesto que según referencias bibliográficas, están relacionados con la acción farmacológica de la especie *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

Después de realizar el análisis del tamizaje fitoquímico los metabolitos secundarios identificados fueron, los fenoles y taninos con cantidades excelentes; cantidades moderadas de flavonoides, catequinas, lactonas, cumarinas y quinonas; asimismo se encontró una escasa cantidad de alcaloides tal como se muestra en la tabla 3.

El proceso de identificación se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina, donde se muestra que existe presencia de flavonoides totales como la quercetina ya que este último se utilizó como estándar, presentando en el cromatograma al observarse a la cámara UV a una longitud de onda de 365 nm manchas de la muestra y el estándar a las mismas alturas, que al determinar su R_f del estándar y muestra, se obtienen R_f muy cercanos con valores de $R_f = 0,90$ de estándar y $R_f = 0,86$ (figura 1); asimismo se puede mencionar en investigaciones diferentes que los valores de R_f obtenidos son de 0,80 según otros autores.⁸

Al realizar el análisis estadístico de la linealidad, teóricamente es la capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen. En este estudio, la linealidad se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (R) y el coeficiente de determinación (R^2). R indica el grado de asociación entre dos variables (en este caso absorbancia y concentración) y R^2 , indica qué tan bueno es el modelo de regresión utilizado. Los criterios de aceptación para ambos parámetros son que R y R^2 deben ser mayores

Correspondencia:

Raúl Nemecio Coronado Bendejú: Raulin_781_3@hotmail.com
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n

que 0,995.⁹ La curva se preparó dentro del rango de cinco concentraciones que van desde 4,0 µg/mL hasta 8,0 µg/mL del estándar de quercetina, obteniéndose la ecuación de la curva de calibración de $y = 0,065x + 0,0088$ donde Y es la absorbancia y X la concentración del estándar y los valores de R y R² obtenidos fueron 0,9995 y 0,9989 respectivamente los cuales se observa en la figura 2; asimismo se realizó la prueba de t student para determinar la significancia estadística de los valores de la pendiente “b”, intercepto “a” y el test de regresión en función de coeficiente de correlación, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ (95 % de confianza) y n-2 grados de libertad.

En el análisis estadístico de la pendiente “b” por método de t student el criterio de aceptación que debe cumplir es que $t_{exp.} > t_{tabla}$; se obtuvieron valores del $t_{exp.}$ igual a 13,733 el cual es mayor que el t_{tabla} igual a 3,182 (anexo 4) entonces cumple con la especificación por lo tanto se acepta la hipótesis alterna donde la pendiente es estadísticamente diferente de cero; seguidamente se determinó la significancia estadística del intercepto “a” por el mismo método donde el criterio de aceptación que debe cumplir es que $t_{tabla} > t_{exp.}$ obteniéndose valores de $t_{exp.}$ igual a 0,698 y t_{tabla} igual a 3,182 el cual es mayor que 0,698 ($t_{expe.}$) (Anexo 4) con estos resultados se acepta la hipótesis alterna donde intercepto “a” es estadísticamente igual a cero; finalmente se determinó la significancia del coeficiente de correlación R donde se obtuvo un valor de $R^2 = 0,9989$; t_{tabla} igual a 3,182 y $t_{expe.}$ igual a 52,197 el cual cumple el criterio de que $t_{exp.} > t_{tabla}$ por tanto se acepta la hipótesis nula donde R es diferente de cero (anexo 2) asimismo el valor de R² es mayor que 0,995, este valor obtenido es muy cercano al que obtuvo Toscano E.¹⁰ con un R² de 0,9985; con estos resultados se afirma que existe correlación entre x (concentración) e y (absorbancia).

También se determinó el coeficiente de variación a partir del factor de respuesta (y/x) obteniendo un valor de 4,594 % siendo menor al 5 % del coeficiente de variación establecido y comprobando se puede afirmar que existe linealidad en el intervalo estudiado (anexo 4). Todo lo anterior nos permite afirmar que existe una buena correlación entre la concentración y la respuesta obtenida (valores de absorbancia), lo cual demuestra linealidad en el rango de las concentraciones estudiadas. Estos resultados demuestran que el método es lineal, se muestra de esta forma que el ensayo cumple de modo apropiado con la Ley de Lambert-Beer, lo cual

indica que se pueda usar la absorbancia como magnitud adecuada para determinar a partir de ella la concentración de principio activo presente en las muestras.¹¹

En el análisis estadístico para la evaluación del parámetro de precisión en función de repetibilidad y precisión intermedia del método se determinó en función de la cantidad y porcentaje de analito hallado en la muestra, obteniendo los siguientes resultados, se muestran las variaciones obtenidas en los porcentajes de analito hallado en la muestra, la media del analito hallado y la desviación estándar relativa, obtenidos intradía (repetibilidad) e interdías (precisión intermedia) que se muestran en la tabla 4 y 5 para repetibilidad y la tabla 6 para precisión intermedia. En la repetibilidad los resultados del coeficiente de variación fueron de 0,26 % y 0,19 %, con respecto a la precisión intermedia se obtuvo un coeficiente de variación de 0,315 %. Los valores de coeficiente de variación por debajo de 1,5 % en análisis de repetibilidad (intradía) y por debajo de 3 % en análisis de precisión intermedia (interdías) son considerados aceptables.⁹ El cumplimiento de ambos estudios nos permiten afirmar que el método es preciso; estos mismos resultados se obtuvieron en el trabajo de estudios sobre la “validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba L*”, donde tuvieron como resultado un coeficiente de variación de 0,28 % afirmando que el método es preciso.¹²

Los valores referentes a la exactitud del método obtenidos por medio de la prueba de recuperación, se encuentran en la tabla 7. El porcentaje de analito recuperado promedio es de 99,8 % y un coeficiente de variación de 0,740 % muestran que el método presenta exactitud, estos valores obtenidos en la determinación están próximos al valor verdadero donde los porcentajes de recuperación entre 96 % - 104 % y coeficiente de variación menor del 3 % son considerados aceptables.⁹ Estos resultados son cercanos a los obtenidos en otras investigaciones, según Travieso M, et al.¹³ los valores obtenidos de recuperación fueron de 100,742 % al igual que Gutiérrez Y¹², obtuvo un 97,44 % de recuperación.

Asimismo se determinó la significancia estadística de la exactitud por el método de t student para un nivel de confianza de $\alpha = 0,05$ (95 % de confianza) y n-2 grados de libertad y especificación que debe cumplir donde $t_{exp} < t_{tabla}$, al procesar los resultados se obtuvo un t_{exp}

Correspondencia:

Raúl Nemecio Coronado Bendezú: Raulin_781_3@hotmail.com
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n

de 0,803 y t_{tabla} de 2,306; los cuales cumplen con dicha especificación. Por lo tanto con estos resultados de coeficiente de variación, recuperación promedio y el t-student se concluye que el método es exacto.

En el parámetro de especificidad o selectividad los resultados que se obtuvieron fueron de $0,0007 \pm 0,0002$ los cuales indican que el placebo no absorbió significativamente en la longitud de onda de trabajo. También se comparó los espectros de absorción del estándar desde los 200 nm hasta los 500 nm el cual se encuentra ilustrado en la figura 3, y nos muestran mismos espectros de absorción tanto del estándar como de la muestra.

La sensibilidad de un método analítico, se define como la pendiente “m” de la curva de calibración, ya que esta define la razón de cambio de la propiedad medida por unidad de concentración. Una respuesta no lineal en la gráfica de Absorbancia vs Concentración indica un cambio en el valor de la sensibilidad en función de la concentración. Conforme la concentración del analito se aproxima a cero, la señal desaparece dentro del ruido y se rebasa el límite de detección. La sensibilidad aunque es independiente de la concentración, se obtiene como el cociente de dividir la señal medida (absorbancia) entre su valor ($m = s/c$), y por lo que se puede observar es simplemente igual a la pendiente promedio.⁹

Se puede observar lo resultados de las absorbancias y concentraciones en la figura 4, se prepararon tres concentraciones del estándar a concentraciones bajas los cuales fueron 0,008; 0,016 y 0,032 $\mu\text{g/ml}$, con estos datos se realizó la curva de regresión lineal para obtener la ecuación de la recta $y = 0,204x + 0,017$ y R^2 igual a 0,9944; con estos datos se procederá a calcular el límite de detección y el límite de cuantificación.

El resultado obtenido para el límite de detección de acuerdo al procedimiento recomendado, fue de 0,003 $\mu\text{g/mL}$ de analito; los valores de límite de cuantificación obtenidos fueron de 0,0072 $\mu\text{g/mL}$ de analito los cuales se pueden observar en el anexo 6.

En cuanto a los resultados de la cuantificación de flavonoide totales por el método descrito por Kostennikova⁷ presentes en la muestra donde se presentan los resultados en la tabla 7, en función del porcentaje de quercetina encontrado en la muestra es de $42,0 \pm 0,12$ % es decir existe 42 gramos de quercetina por 100 gramos de muestra, asimismo Ortega A.¹⁴ en su trabajo de investigación sobre la determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes

en extractos alcohólicos de semilla de chía presentan un 60,49 % de quercetina; la cuantificación de flavonoides expresado como porcentaje de quercetina descrita por Mota J.¹⁵ quien reportó concentraciones de flavonoides en extracto metanólico de chía con valores cinco veces menores de 60,49 %. En el trabajo de investigación realizado por Ruiz S. ed at¹⁶ reporta 0,48 % de quercetina; asimismo en otra investigación se reportó el contenido de flavonoides totales en propoleo con un 11,45 % de quercetina.¹⁷

En un trabajo de investigación sobre Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante, concluye con la presencia de un 15 % de quercetina hallado en las muestras de té.¹⁸

Estas diferencias pueden deberse a numerosos factores como la ecología de la flora, periodo de colecta, región de la colecta, exposición a la luz del extracto y el solvente que se utiliza, los cuales pueden afectar el contenido de flavonoides debido a que se oxidan fácilmente.¹⁹

Todo el estudio desarrollado nos permite afirmar que el método espectrofotométrico propuesto para la cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina, validados para el control químico de calidad de la droga cruda de *Calceolora engleriana* Kraenzl, son fiables, pues demuestran mantener los criterios fundamentales de linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud y especificidad.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. Plantas Medicinales de Uso en Chile. Química y Farmacología. Chile. Editorial Universal. 2001. p.15–16.
2. Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* Vol. 22(1):48-57.
3. Shap J. Quality in manufacture of medicines and other healthcare products. Part 5: Quality control. London: Pharmaceutical Press; 2000. p. 283-358.
4. Molau, U. 2003. Two new species of *Calceolaria* (Scrophulariaceae) from the Tropical Andes. *Novon* 13: 101-103.
5. Miranda M, Cuéllar A. (1992). Manual de prácticas de laboratorio farmacognosia y productos naturales. Cuba: Editorial Ciencia y Educación.
6. Pharmacopeia brasileira. 2010. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria ANVISA,

Correspondencia:

Raúl Nemeccio Coronado Bendejú: Raulin_781_3@hotmail.com
 Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
 Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n

- volumen 1, 5° edición. Brasil. Disponible en:
www.anvisa.gov.br/hotsite/cd.../pdf/volume1%2020110216.pdf
7. Kostennikova Z. UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya* 1983; 33(6):83-6.
 8. Toso E. y Skliar M. Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Compuestos con Actividad Gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.Pam. – 2002. Disponible en:
<http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n04a03toso.pdf>.
 9. AEFI. Asociación Española de Farmacias de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. 2001.
 10. Toscano E, Loja B. y Garrido P. Cuantificación de flavonoides totales en una bebida mixta de quinua, kañiwa y kiwicha. Instituto de Investigación, Medicina Tradicional y Farmacología, Bioquímica y Nutrición. Universidad de San Martín de Porres. [Revista en internet]. 2014 [acceso 15 de junio de 2016]. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/260676189>.
 11. Massart DL, Verbeke JS. An introduction to method validation. *Analisis Magazine*. [Revista en internet]. 1994 [acceso 15 de junio de 2016]; 2(5). Disponible en:
<http://Method%20validation%20and%20development.pdf>.
 12. Gutiérrez Y, Miranda M, Varona N, Rodríguez A. Validación de 2 Métodos Espectrofotométricos para la cuantificación de Taninos y Flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba* L. *Rev Cubana Farmacia*; Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. [Revista en internet]. 2000 [acceso 08 de diciembre de 2015]; 34(1): 50-5. Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/pdf/far/v34n1/far07100.pdf>.
 13. Travieso M, et al. Validación del método de cuantificación de taninos totales en formulaciones semisólidas de *rhizophora mangle* L. (mangle rojo). *Rev Cubana de plantas Medicinales*. [Revista en internet]. 2011 [acceso 08 de julio de 2016]; 16(1): 83-93. Disponible en: <http://>
<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla09111.pdf>.
 14. Ortega A, López A. y González B. Determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chía (*salvia hispánica* L.) *Revista de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. [Revista en internet]. 2016 [acceso 08 de julio de 2016]; 1(2): 424-429. Disponible en:
<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volumel/2/4/73.pdf>
 15. Mota J. Determinación del efecto vasorelajador del extracto metanólico de *Salvia hispánica* L. en anillos aislados de aorta en ratas. [Tesis de licenciatura]. Monterrey: Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2012.
 16. Ruiz S. et al. Capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *sambucus peruviana* h.b.k. (sauco) proveniente de la ciudad de Huamachuco. *Revista farmacencia*. [Revista en internet]. 2013 [acceso 15 de junio de 2016]; 1(2). Disponible en:
<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/464/419>
 17. Alves E, Hashime E. contenido de fenoles, flavonoides totales y actividad antioxidante de la muestra de propolis comercial. *Revista de Ciencias Farmacéuticas Básica y Aplicada*. [Revista en internet]. 2009 [acceso 04 de julio de 2016]; 16(3): 388-395. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a13.pdf>
 18. Venegas E. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Revista UCV – scientia*. [Revista en internet]. 2012 [acceso 04 de julio de 2016]; 4(2). Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4369412.pdf>
 19. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition* [Revista en internet]. 2004, 79(1):727-47. Disponible en:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113710

Correspondencia:

Raúl Nemecio Coronado Bendejú: Raulin_781_3@hotmail.com
 Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
 Facultad de Ciencias de la Salud – Av. Independencia s/n