



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA & FARMACIA

**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DEL MARCADOR FITOQUÍMICO
DEL EXTRACTO DE *Aristeguetia glutinosa* LAM, UTILIZADO EN
EL PRODUCTO “MATICO DEL DR. PEÑA®” TABLETAS EN EL
LABORATORIO NEO FÁRMACO DEL ECUADOR
NEOFARMACO CIA. LTDA.”**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MELISSA CECILIA FIALLOS LOZADA

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2018

©2018, Melissa Cecilia Fiallos Lozada

Se autoriza la publicación con fines académicos del presente documento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo: Proyecto de Investigación “DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL MARCADOR FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE *Aristeguietia glutinosa* LAM, UTILIZADO EN EL PRODUCTO “MÁTICO DEL DR. PEÑA®” TABLETAS EN EL LABORATORIO NEO FÁRMACO DEL ECUADOR NEOFARMACIA. LTDA.” de responsabilidad de la señorita Melissa Cecilia Fiallos Lozada, mismo que ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
BQF. Valeria Isabel Rodríguez Vinueza PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	-----	-----
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	-----	-----
Dr. Carlos Pilamunga Capus MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----

Yo, MELISSA CECILIA FIALLOS LOZADA, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación, y el patrimonio intelectual del mismo pertenece al LABORATORIO NEO FARMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA.

Melissa Cecilia Fiallos Lozada

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación lo dedico a tres seres maravillosos y pilares fundamentales en mi vida. A los que no solo respeto y amo, por todo lo que representan, sino que admiro, porque cada uno de ellos, son mi ejemplo a seguir;

Mis padres Fabián y Cecilia, que siempre han estado a mi lado siendo mi motor, aconsejándome, brindándome su amor, apoyo y confianza. Gracias a ustedes, a sus enseñanzas a su esfuerzo y superación, soy lo que soy.

Mi hermano Fabián Efraín, gracias por ser mi mejor e incondicional amigo y por demostrarme que no existe ningún obstáculo para cumplir nuestras metas, si todo lo hacemos de corazón con humildad, esfuerzo y constancia.

Melissa

AGRADECIMIENTO

A Dios por todas las bendiciones derramadas sobre mí, a lo largo de mi vida estudiantil. A mi Familia por todos los consejos, animo, apoyo y sobre todo comprensión para conmigo, en todo momento.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a mi querida Escuela de Bioquímica y Farmacia, y en ella a docentes y amistades, que contribuyeron y formaron parte de este largo camino hacia mi formación profesional.

Al LABORATORIO NEO FÁRMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA., por haberme abierto las puertas, dándome la oportunidad de afianzar mis conocimientos en el campo laboral y permitirme realizar mi trabajo de titulación en esta prestigiosa institución.

A los Bioquímicos Farmacéuticos Carlos Pazmiño y Mayra Tinajero quienes con su experiencia y conocimiento han sabido guiarme de la mejor manera para llevar a cabo el presente proyecto, de forma enriquecedora y con buenos resultados.

Al Bioquímico Farmacéutico Diego Vinueza, que como tutor y docente me brindó la asesoría, confianza y el apoyo necesario para la realización de este proyecto. De la misma manera al Doctor Carlos Pilamunga por la colaboración y asesoramiento técnico brindado.

Melissa

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	2
1.1. Marco teórico.....	3
<i>1.1.1. Taxonomía.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. Ubicación.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3. Descripción botánica.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.4. Propiedades y usos.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.5. Estudios farmacológicos.....</i>	<i>5</i>
1.2. Marcadores fitoquímicos.....	5
<i>1.2.1. Flavonoides.....</i>	<i>7</i>
1.3. Desarrollo de Métodos Analíticos.....	9
<i>1.3.1. Fases del desarrollo de métodos analíticos.....</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2. Clasificación de métodos analíticos.....</i>	<i>9</i>
<i>1.3.3. Aislamiento de compuestos de una matriz vegetal.....</i>	<i>11</i>
<i>1.3.4. Técnicas Cromatográficas.....</i>	<i>12</i>
<i>1.3.4.1. Clasificación de las técnicas cromatográficas.....</i>	<i>12</i>
<i>1.3.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia – HPLC.....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.4.2.1. Parámetros cromatográficos.....</i>	<i>15</i>
1.4. Validación de métodos analíticos.....	22
<i>1.4.1. Consideraciones previas.....</i>	<i>24</i>
<i>1.4.2. Tipos de validación.....</i>	<i>24</i>
<i>1.4.3. Estrategia de validación.....</i>	<i>25</i>
<i>1.4.4. Protocolo de validación.....</i>	<i>25</i>
1.5. Esquematización del proceso.....	29

CAPITULO II

2	MARCO METODOLÓGICO.....	30
2.1	Materiales, equipos y reactivos.....	30
2.2	Desarrollo del método analítico	32
2.3	Validación del método analítico.....	33
2.3.1	<i>Preparación de soluciones.....</i>	33
2.3.2	<i>Parámetros de desempeño a evaluar.....</i>	34
2.3.2.1	<i>Selectividad.....</i>	35
2.3.2.2	<i>Linealidad y rango.....</i>	35
2.3.2.3	<i>Exactitud.....</i>	36
2.3.2.4	<i>Precisión.....</i>	37
2.3.2.5	<i>Robustez.....</i>	38
2.3.2.6	<i>Estabilidad.....</i>	39
2.3.2.7	<i>Idoneidad Del Sistema (system suitability).....</i>	42
2.3.2.8	<i>Incertidumbre de la medición.....</i>	42
2.3.3	<i>Registro y revisión de datos.....</i>	44

CAPITULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	45
3.1	Resultados.....	45
3.1.1	<i>Desarrollo del método.....</i>	45
3.1.2	<i>Validación del método.....</i>	46
3.1.2.1	<i>Selectividad.....</i>	46
3.1.2.2	<i>Linealidad y Rango.....</i>	49
3.1.2.3	<i>Exactitud.....</i>	54
3.1.2.4	<i>Precisión.....</i>	55
3.1.2.5	<i>Robustez.....</i>	57
3.1.2.6	<i>Estabilidad.....</i>	61
3.1.2.7	<i>Idoneidad del sistema.....</i>	62
3.1.2.8	<i>Incertidumbre de la medición.....</i>	63
	CONCLUSIONES.....	64
	RECOMENDACIONES.....	65

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1. Descripción de las principales clases de compuestos fenólicos, en base a su estructura básica.....	7
Tabla 2-1. Principales propiedades de flavonoides en base a su clase y distribución natural....	7
Tabla 3-1. Clasificación de las categorías de métodos analíticos en dependencia a su propósito en la investigación.....	11
Tabla 4-1. Clasificación general de las técnicas cromatográficas, según el tipo y fase estacionaria utilizada.....	13
Tabla 5-1. Aplicación de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en diferentes tipos de industrias.....	15
Tabla 6-1. Límites de concentraciones para el intervalo de especificaciones conforme a farmacopea de los Estados Unidos USP, en dependencia del analito.....	26
Tabla 7-1. Límites de concentraciones para el coeficiente de recuperación (exactitud), aceptable para productos farmacéuticos.....	26
Tabla 8-1. Límites de aceptación para el coeficiente de variación en dependencia del método de análisis y el criterio a evaluar.....	27
Tabla 1-2. Pesos y diluciones para la realización del parámetro de selectividad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	35
Tabla 2-2. Pesos y diluciones del parámetro de Linealidad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	36
Tabla 3-2. Diseño experimental para la realización del parámetro de precisión intermedia. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	37
Tabla 4-2. Pesos y diluciones para el parámetro robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	37
Tabla 5-2. Factores y niveles de influencia para la realización del parámetro de robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	38

Tabla 6-2. Factores experimentales para la realización del diseño de cribado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	38
Tabla 7-2. Variables respuestas establecidas para el diseño experimental (unidad). Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	38
Tabla 8-2. Combinaciones de factores y niveles para el diseño experimental. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	39
Tabla 9-2. Intervalo de tiempo para el análisis de estabilidad de la solución. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	39
Tabla 10-2. Pesos y diluciones para el ensayo de Estabilidad de la solución. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	40
Tabla 11-2. Pesos y diluciones para la realización del ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	40
Tabla 12-2. Pesos y diluciones de la solución control para el ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	41
Tabla 13-2. Pesos y diluciones de la solución 2., para el ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	41
Tabla 14-2. Pesos y diluciones de la solución blanco para el ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	41
Tabla 15-2. Criterios de aceptación en base a normativa y los resultados del proyecto. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	42
Tabla 1-3. Condiciones para el análisis por en Cromatografía líquida de alta eficiencia. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	45
Tabla 2-3. Resumen de los resultados del parámetro de selectividad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	45
Tabla 3-3. Resumen de los resultados del parámetro de linealidad y rango. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	49
Tabla 4-3. Verificación de varianza de la linealidad del estándar de quercetina. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	51

Tabla 5-3. Verificación de varianza de la linealidad del placebo cargado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	52
Tabla 6-3. Comparación de linealidad estándar de quercetina vs linealidad placebo cargado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	53
Tabla 7-3. Resumen de los resultados del parámetro exactitud. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	54
Tabla 8-3. Resumen de los resultados del parámetro de Precisión. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	54
Tabla 9-3. Análisis anova para el estándar de quercetina. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	55
Tabla 10-3. Análisis anova para el análisis del placebo cargado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	55
Tabla 11-3. Resumen de los resultados del parámetro de robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	56
Tabla 12-3. Estimación de los efectos de cada factor sobre las variables repuesta. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	57
Tabla 13-3. Condiciones óptimas de robustez para la variable TIEMPO DE RETENCIÓN. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	58
Tabla 14-3. Condiciones óptimas de robustez para la variable FACTOR DE ASIMETRIA. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	59
Tabla 15-3. Condiciones óptimas de robustez para la variable NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	59

Tabla 16-3. Resumen de los resultados del parámetro estabilidad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	60
Tabla 17-3. Resumen de los resultados del parámetro de Idoneidad del sistema. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	61
Tabla 18-3. Resumen de los resultados de la incertidumbre de la medición.. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3-1 <i>Aristeguietia glutinosa</i> LAM. R.M.King & H.Rob.	3
Figura 2-1. Vías metabólicas básicas de los principales metabolitos secundarios.....	6
Figura 3-1. Estructura básica de los Flavonoides.....	8
Figura 4-1. Estructura de la Quercetina.....	9
Figura 5-1. Estrategia general de aislamiento de compuestos bioactivos.....	11
Figura 6-1. Fase estacionaria de la Cromatografía en Fase Reversa.....	14
Figura 7-1. Ecuación para el cálculo de la capacidad cromatográfica.....	16
Figura 8-1. Ecuación para el cálculo de la eficiencia cromatográfica.....	17
Figura 9-1. Ecuación para el cálculo de la Asimetría.....	18
Figura 10-1. Equipo de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	18
Figura 11-1. Sistema de bombas cuaternarias.....	19
Figura 12-1. Automuestreador.....	20
Figura 13-1. Influencia del pH en la ionización.....	23
Figura 1-2. MATICO DEL DR. PEÑA® TABLETAS.....	30
Figura 2-2. Etapas en el desarrollo de métodos analíticos.....	32
Figura 3-2. Ecuaciones para el cálculo de la incertidumbre.....	41
Figura 3-2. Diagrama de Ishikawa para cálculo de la incertidumbre.....	41
Figura 1-3. Cromatografía en capa fina (Extracto Vs. Quercetina, Luteolina y Apigenina)....	44
Figura 2-3. Espectro del estándar de Quercetina con detector PDA.....	47
Figura 3-3. Topograma del Estándar de Quercetina con detector PDA.....	47
Figura 4-3. Espectros de Matico Del Dr. Peña® TABLETAS con detector PDA.....	48
Figura 5-3. Topograma de los Espectros de Matico Del Dr. Peña® TABLETAS con detector PDA.....	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1. Esquema del proceso de desarrollo y validación del método analítico.....	29
Gráfico 1-3. Gráfica de residuos – Linealidad Estándar de Quercetina.....	52
Gráfico 2-3. Gráfica de residuos – Linealidad Placebo Cargado.....	52
Gráfico 3-3. Esquema de Cuantiles Estándar de Quercetina vs Placebo.....	53
Gráfico 4-3. Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia.....	57
Gráfico 5-3. Malla superficie respuesta para la variable tiempo de retención.....	58
Gráfico 6-3. Malla superficie respuesta para la variable factor de asimetría.....	58
Gráfico 7-3. Malla superficie respuesta para la variable número de platos teóricos.....	59
Gráfico 8-3. Representación gráfica de la evaluación de la incertidumbre de la medición.....	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Cromatogramas correspondientes al análisis del parámetro selectividad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Anexo B. Rectas de regresión correspondientes al análisis del parámetro linealidad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Anexo C. Cromatogramas correspondientes al análisis del parámetro Precisión. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Anexo D. Cromatogramas correspondientes a las condiciones óptimas establecidas en el análisis del parámetro robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Anexo E. Cromatogramas correspondientes al análisis del parámetro de estabilidad del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Anexo F. Reporte del test de idoneidad del sistema del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Anexo G. Certificado de análisis de la columna cromatográfica utilizada en el desarrollo y validación del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Anexo H. Certificado de validación del programa estadístico empleado en el proceso de validación del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

Anexo I. Evidencia fotográfica del desarrollo y validación del método analítico para la determinación del marcador fitoquímico en el producto MATICO DEL DR. PEÑA® Tabletas. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACRÓNIMO	DESCRIPCIÓN
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
OMS	Organización Mundial de la Salud
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
AEFFI	Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria
ANOVA	Análisis de Variancia
CCF/TLC	Cromatografía en capa fina
CV	Coficiente de Variación
RSD	Desviación estándar relativa
DAD	Detector de diodos
UV	Ultravioleta
°C	Grados centígrados
R_s	Resolución
K	Capacidad
α	Selectividad
N	Eficiencia

RESUMEN

El presente proyecto de investigación, expone el desarrollo y la validación del método analítico para la determinación del marcador fitoquímico del extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM, en MATICO DEL DR. PEÑA® Tabletas. En la primera etapa, dentro del desarrollo del método analítico se contemplaron los estudios previos realizados al extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM, donde se establecen a los flavonoides como metabolitos de interés, empleando para su obtención una técnica de extracción líquido-líquido, que consistió en el uso de solventes orgánicos, para desengrasar la muestra y una hidrólisis forzada tras la adición de un medio ácido y la elevación de temperatura, para obtener a los flavonoides en su forma aglicona. Posteriormente se acondicionó la muestra para su análisis tanto en cromatografía de capa fina como cromatografía líquida de alta eficiencia; técnicas con las que se realizaron pruebas confirmatorias frente a varios estándares de flavonoides conocidos, con lo que se pudo definir a Quercetina como el marcador fitoquímico. En la siguiente etapa y tras el estudio de las características biofarmacéuticas y fisicoquímicas de Quercetina, se estableció y elaboró el protocolo para la validación del método analítico, en base a reportes de la OMS, ICH, AEFI y USP; para productos farmacéuticos y productos naturales. Finalmente, se logró validar la metodología de análisis desarrollada obteniendo muy buenos resultados y estableciendo como marcador fitoquímico del extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM a Quercetina, cumpliendo con el propósito del método analítico creado, que fue la valoración en rutina, tanto de la materia prima MATICO DEL DR. PEÑA® Extracto, como del producto terminado MATICO DEL DR. PEÑA® Tabletas, dentro del Laboratorio NEO FÁRMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA. Además, es trascendental concientizar el apoyo a este tipo de proyectos, tanto a nivel de la academia como a nivel de empresa privada, para que de esta forma el país potencialice el comercio de productos naturales de calidad.

PALABRAS CLAVE: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <METODOLOGIA ANALITICA>, <VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO>, <CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)>, <FLAVONOIDES>, <MARCADOR FITOQUIMICO>, <FITOMEDICAMENTOS>.

ABSTRACT

The present investigation aims developing and validating of the analytical method for purpose of phytochemical marker *Aristeguietia glutinosa* extract LAM, from MATICO DE® DR. PEÑA ® Tablets. In the first stage, in the development analytical method, previous studies were contemplated to extract from *Aristeguietia glutinosa* LAM, flavonoids are established as metabolites of interest, using a liquid-liquid extraction technique to obtain them. Consisted of the use of organic solvents, to degrease the sample and a forced hydrolysis after the addition of an acidic medium and rise of temperature, to obtain the flavonoids in their glycine form. Afterwards, the sample was conditioned for its analysis both in chromatography of each fine and liquid chromatography of high efficiency; techniques with confirmatory tests were carried out against several known flavonoid standards, with Quercetin could be defined as the phytochemical marker. Then, after the study of biochemical and phytochemical characteristics of Quercetin and protocol for validation about analytical method were established and elaborated, based on reports from WHO, ICH, AEFI and USP; for pharmaceutical and natural products. After study from biochemical and phytochemical characteristics of Quercetin, the protocol for validation of analytical method was established and elaborated, based on reports from WHO, ICH, AEFI and USP; for pharmaceutical and natural products. Finally, methodology of analysis developed was obtained validation obtaining very good results and establishing as a phytochemical marker for *Aristeguietia glutinosa* LAM to Quercetin, fulfilling the purpose of the analytical method created, which was the routine assessment of both raw material MATICO FROM DR. PEÑA ® Extract, as the finished product MATICO DEL DR. PEÑA ® Tablets; inside the Laboratory NEO FÁRMACO DEL ECUADOR NEOFÁRMACO CIA. LTDA. In addition, it is important to raise awareness of support for this type of project, both the academic level and as level of private enterprise, so that the country can potentiate trade of quality natural products.

KEY WORDS: <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <ANALYTICAL METHODOLOGY>, <VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHOD>, <HIGH-EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)>, <FLAVONOIDS>, <PHYTOCHEMICAL MARKER>, <PHYTOMEDICAMENTS>.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar el método analítico para la determinación del marcador fitoquímico del extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM, utilizado en el producto en el producto "Matico del Dr. Peña®" Tabletas en el LABORATORIO NEO FARMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Definir el marcador fitoquímico del extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM, mediante pruebas confirmatorias frente a estándares de compuestos de naturaleza similar y en base a estudios previos.
- Establecer el método de extracción y acondicionamiento de la muestra, para la obtención del marcador fitoquímico a partir del extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM.
- Emplear la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia – HPLC, para la determinación del marcador fitoquímico presente en el extracto *Aristeguietia glutinosa* LAM.
- Demostrar que el método analítico es el adecuado para el propósito establecido, por medio del análisis de los parámetros contemplados en el protocolo de validación.

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país caracterizado por su prodigiosa biodiversidad, siendo considerado uno de los más ricos a nivel mundial, en referencia tanto de su compendio de flora y fauna como a su cultura ancestral, en la curación enfermedades, es por ello que se hace evidente el creciente interés por el uso de "medicamentos naturales" o fitomedicamentos, como terapia alternativa, en el país y en todo el mundo, naciendo la importancia del control de este tipo de productos, mediante técnicas modernas que aseguren su composición y producción. Esto involucra directamente a la industria farmacéutica, quien sería la principal beneficiada al implementar protocolos de producción y análisis de fitomedicamentos con tecnología moderna que garantice al paciente consumir un producto de calidad y seguridad y que además sea de origen natural, por lo que tendría mayor aceptación por los consumidores.

Por otra parte, la validación de estos procesos dentro de la industria juega un papel fundamental ya que permite tener la evidencia necesaria que demuestre que dentro de las condiciones que un determinado laboratorio posea, los resultados obtenidos de un análisis sean fiables y cumplan con su propósito, todo esto apoyándose en el uso de tecnologías modernas que cumplan con los criterios de la distintas farmacopeas, como por ejemplo la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), que permite realizar el análisis de un gran número de muestras con alta sensibilidad y en menor tiempo, reduciendo de esa forma el consumo de solventes.

Además es importante mencionar el gran desafío que representa extrapolar dichas técnicas al análisis de una matriz vegetal, ya que en ella los compuestos no se van a encontrar de forma aislada, por lo que, el desarrollo y validación de nuevos métodos analíticos para la determinación de marcadores fitoquímicos en medicamentos naturales en el país, marca una nueva tendencia incentivando al Bioquímico Farmacéutico a ser más que un analista, un investigador, que impulse el desarrollo del país en base a nuestros propios recursos, creando productos de calidad dirigidos a conservar la salud de la población.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

Históricamente la fitoterapia comienza con la civilización, donde conocimiento y uso de plantas y fármacos derivados de ellas, fueron difundidos desde China, Grecia y Egipto hacia Europa y el mundo occidental mediante registros que demuestran que existen propiedades en los vegetales que producen efectos beneficios para la salud humana. (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 3). Siendo utilizadas desde su forma cruda en el tratamiento o cura de distintas afecciones o como base en el desarrollo de nuevos medicamentos. (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 73).

En los últimos años se ha visto que para la preparación de medicamentos a base de productos naturales es necesaria la fusión de varias disciplinas ya que el desconocimiento de técnicas para su correcta obtención y formulación va a incidir negativamente en el mecanismo de acción o actividad biológica de los componentes vegetales. (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 5-7). Mientras el uso de los "medicamentos naturales" va en aumento debido a los diferentes problemas y/o reacciones adversas registradas por el uso de medicamentos de origen sintético, la OMS establece pautas generales para el análisis de este tipo de preparaciones de origen natural, importante para garantizar, su calidad, seguridad y eficacia. (Davies, I., 2009 p.3).

En tanto a la tendencia actual de la academia acerca de la investigación de métodos de análisis para determinar marcadores fitoquímicos, se centra en el empleo de técnicas modernas como, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) y Cromatografía de gases (GC), acoplados a un detector UV o Masas, conformando una parte integral dentro de la evaluación de plantas medicinales. (Joyce, G. et al., 2016, p. 2).

Generalmente los compuestos que le dan la actividad a un medicamento deben cumplir con rigurosos estándares que se encuentran establecidos en las farmacopeas, documentos certificados que sirven de herramientas para avalar la calidad del medicamento. Sin embargo y pese al gran número de plantas utilizadas en medicamentos, estas en su gran mayoría, no se encuentran incluidas en dichos documentos. (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 6-9) Ya que al día de hoy prácticamente todos los entes reguladores ponen como un parámetro obligatorio cumplir con la Validación del método analítico a utilizar sobre especies vegetales, donde el principal objetivo es demostrar que el método es adecuado para los propósitos establecidos y en

determinas condiciones. Además, la validación ofrece confianza y seguridad para cumplir con las especificaciones legales del medicamento como la implementación de las BPM, todo esto bajo una serie de registros que permiten tener pruebas documentales del proceso, para lo cual se tiene como referencia documentos de validación para especies farmacéuticas encontrados en; OMS, ICH y AEFI (AEFI, 2001 p.45).

En el Ecuador la falta de estudios modernos, es lo que dificulta establecer un control apropiado que garantice la seguridad y calidad de los fitomedicamentos, siendo importante para la industria implementar métodos analíticos validados aplicables a productos naturales en base a estatutos internacionales como el Anexo 2 del reporte técnico de la OMS, en el que se menciona la importancia de establecer la vida útil de los productos naturales, mediante pruebas de estabilidad que proporcionan evidencia de como la calidad de los mismos no varía frente a varios factores ambientales, así como las pruebas tradicionales de control de acuerdo a la forma farmacéutica a analizar. Contribuyendo de esta forma al ente regulador en la implementación de parámetros de control a considerar en la realización de fitomedicamentos, además de convertirse en una empresa más competitiva, estando a la vanguardia de nuevas técnicas analíticas para productos naturales. (OMS, 2009 pp.89-125).

Por lo que la problemática que del presente trabajo de titulación, fue la necesidad de desarrollar y validar un método de análisis por HPLC, para el análisis en rutina del producto Matico Del Dr. Peña® Tabletas, dentro del Laboratorio NEO FARMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA.

1.1 Marco teórico

Aristeguietia glutinosa LAM



Figura 1-1 *Aristeguietia glutinosa* LAM. R.M.King & H.Rob.
Fuente: Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador

1.1.1 Taxonomía

Reino: *Plantae*

División: *Tracheophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Familia: *Compositae*

Especie: *Aristeguetia glutinosa* LAM

Sinónimos: *Eupatorium glutinosum* LAM.; *Conoclinium rugosum* Turcz.

Nombre común: Matico, Yerba del soldado, chuzalongo, matigo, migla. (King, R. & Robinson, H., 1975 pp. 217-220)

1.1.2 Ubicación

Aristeguetia glutinosa LAM, es una especie endémica del Ecuador, que se encuentra geográficamente distribuida en ciudades como, Azuay, Cañar, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, a una altura de entre los 3000-4000 msm. (Trópico, 2017 p.1).

1.1.3 Descripción botánica

Arbusto perenne que alcanza una altura de 1 a 3 m., con la presencia de ramas grises, hojas aromáticas de color verde brillante de 7 a 10 cm de largo por 2,5 a 3,5 cm de ancho, de ápice agudo, margen dentado, haz rugosa y envés ligeramente albino. Las flores son tubulares, en espiga solitarias, de tonalidad fucsia e inflorescencias amarillas. (King, R. & Robinson, H., 1975 pp. 217-220)

1.1.4 Propiedades y usos

En medicina tradicional se conoce su empleo en diversas afecciones como, la cicatrización de heridas, tratamiento de úlceras, hemorroides e infecciones urogenitales. (El-Seed, H. et al., 2002 pp.728-729)

Estudios previos de la especie, describen ciertos componentes aislados del extracto metanólico de Matico poseen actividad antibacteriana, que tras su análisis estructural se estableció que eran diterpenos tipo copalano. (El-Seed, H. et al., 2002 pp.728-729). Existen otros estudios que resaltan su actividad anti fúngica debido a la presencia de triterpenos. (Valera J. et al., 2014, pp. 5-6).

Las hojas en decocción se usan como cicatrizante en el tratamiento de hemorragias y en lavados antisépticos sobre heridas, en infusión se las utiliza para evacuar cálculos biliares y para aliviar enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio, expectorante y antitusígeno) en dolencias gastrointestinales (empacho, diarreas agudas y crónicas) y tópicamente en infusión de las hojas para gárgaras, además es utilizada como emoliente y protector de la piel. Por otro lado estudios sobre la especie mencionan la actividad anti fúngica y antimicrobiana del matico, empleándose en la actualidad para la elaboración de jabones antisépticos siendo comercializados con éxito. (Valera J. et al., 2014, pp. 19-43)

1.1.5 Estudios farmacológicos

NEOFARMACO CIA. LTDA., es una empresa caracterizada por la calidad y el alto grado de innovación que poseen sus productos, siendo unos de los más destacados la línea de fitomedicamentos a base de extracto de Matico conocida como "MATICO DEL DR. PEÑA®", que tras varios años dedicados a la investigación de su actividad farmacológica, con estudios sobre su;

- Actividad antiinflamatoria
- Actividad gastroprotectora
- Actividad Antimicrobiana
- Actividad Antimicótica.
- Estudio de Toxicidad Aguda (LD₅₀) (Peña R. et al., 2016 pp. 2-6)

Los cuales han sido de gran importancia para cumplir con los requisitos necesarios para los correspondientes Registros sanitarios, no obstante y debido al gran avance de la ciencia en los últimos tiempos las técnicas analíticas modernas están jugando un papel fundamental, para garantizar de forma mucho más precisa la calidad y seguridad de los productos de origen natural. (Peña R. et al., 2016 pp. 2-6)

1.2 Marcadores fitoquímicos

Históricamente, el reino vegetal cumple un papel fundamental para la medicina. Siendo las plantas una fuente abundante de compuestos a los que se les atribuye propiedades terapéuticas, dichos compuestos son conocidos como metabolitos secundarios tradicionalmente considerados tóxicos, no obstante, presentan funciones como; de protección frente a los depredadores (fitoalexinas), señalización y atrayentes de insectos que estimula la polinización (antocianos), etc. (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 65)

La importancia de estas funciones ha incrementado el interés en el estudio de varias especies, para lo cual, los principales órganos de las plantas a estudiar son: Hoja, flor, fruto, corteza, raíz y bulbo. (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp.17). Es por esto que cada familia, género y especie de plantas genera una categoría química distinta o una mezcla de ellas, por lo que en ocasiones esto sirve en la identificación taxonómica de las mismas. Gracias a esto los metabolitos secundarios identificados en ellas se pueden clasificar a su vez en función de su estructura química, composición, vía de síntesis o solubilidad. En términos generales es posible distinguir 3 vías metabólicas principales para la producción de estos compuestos; Figura 2-1 (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 60)

- a) Ácido shikimico
- b) Acetato
- c) Mevalonato

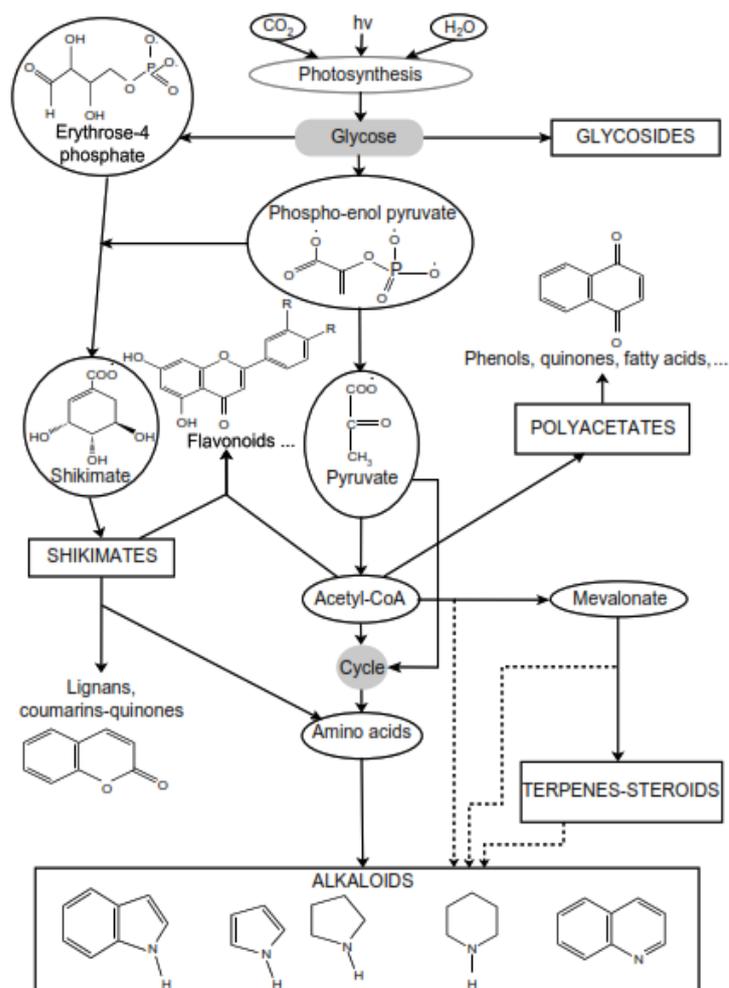


Figura 2-1. Vías metabólicas básicas de los principales metabolitos secundarios

Fuente: Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 61

De aquel conjunto de vías metabólicas se puede diferenciar a los terpenoides, formados a partir de cadenas carbonadas (mevalonato), justificando su abundancia en los productos naturales. Otro grupo de gran importancia lo conforman los compuestos fenólicos Tabla 1-1., mismos que se pueden sintetizar a través de dos vías; (a) Ácido shikímico, como por ejemplo lignanos, cumarinas y los derivados de Ac. benzoico. (b) Acetato, que en primera instancia conduce a compuestos poliacetatos y que luego de la ciclación da lugar a las quininas y xantonas.

Por otro lado existen otro grupo de fenoles que se destacan por su gran potencial investigativo, siendo considerados “antioxidantes por excelencia”, debido a la presencia de un anillo central de origen pirano, aparte de muchas otras aplicaciones biológicas, estos son los flavonoides, encontrándose en su gran mayoría de forma glicosilada en su estado natural, lo que ha contribuido en funciones ecológicas dentro del vegetal (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 62)

Tabla 1-1 Descripción de las principales clases de compuestos fenólicos, en base a su estructura básica.

ESTRUCTURA BÁSICA	CLASE	FUNCIÓN
6C	Fenoles simples, benzoquinonas, Quinonas	Sustancias alelopáticas Fungicida
9C	Ácido hidroxicinámico, Cumarinas	Sustancias alelopáticas fitoalexinas
15C	Flavonoides, isoflavonoides, antocianos, chalcones, auronos	Pigmentación de flores y frutos, fungicida, fitoalexinas
18C	Lignanos	Antioxidantes, fitoestrógenos
30C	Biflavonoides	Antioxidantes, actividad antimicrobiana

Fuente: Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 63

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

1.2.1 Flavonoides

Compuestos orgánicos, que estructuralmente provienen de la flavona, sustancia encontrada en plantas del genero *Primula spp.* Con características similares se puede encontrar las principales clases de estos compuestos. En su estado natural los flavonoides, se presentan en mezclas de diferentes clases de ellos y es muy extraño encontrarlos aislados en tejidos vegetales. (Asen *et al.*, 1972) Tabla 2-1.

Tabla 2-1. Principales propiedades de flavonoides en base a su clase y distribución natural.

CLASE	DISTRIBUCIÓN	CARACTERISTICAS
Antocianinas	Se encuentran en malva y pigmentos de flores azules; también en hojas y otros Tejidos	Es soluble en agua y es visible a un max. 515 a 545 nm
Flavonoles		Luego de la hidrólisis ácida, son manchas amarillas brillantes en luz ultravioleta y al espectro son visibles a max. 350 a 386 nm
Flavones	Principalmente incoloros, son también co-pigmentos en ambos extremos, ciánico y aciánico en; Flores y hojas	Después de la hidrólisis ácida, sin brillo manchas marrones absorbentes en un espectral max. De 330 a 350 nm.
Glycoflavones		Contienen un azúcar enlazado a CC; móvil en el agua a diferencia flavonas normales
Flavanones	Incoloros; en hojas y frutas (especialmente agrias)	Presenta colores intensos en tonalidad rojiza con MgjHCl; sabor amargo

Fuente: J. B. Harborne, 1973 pp. 52

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

A este grupo de compuestos generalmente se los encuentran en las plantas, unidos a azúcares como glucósidos, lo que origina dificultad en su análisis donde se emplean distintos mecanismos de hidrolisis que permitan su obtención en forma aglicona. Además muestran gran afinidad al agua al estar en forma glicosilada, por lo que para disolverlos como agliconas, en la mayoría de casos se emplean alcoholes como el etanol y metanol. (J. B. Harborne, 1973 pp. 52)

En cuanto a su estructura son compuestos con sistemas aromáticos conjugados (dos anillos de 6C; A-B), unidos por un puente de tres carbonos a un ciclo (tercer anillo de 6C; C) Figura 3-1. Lo que le atribuye la presencia al espectro de bandas de absorción intensas en la zonas del UV y visible. (J. B. Harborne, 1973 pp. 53)

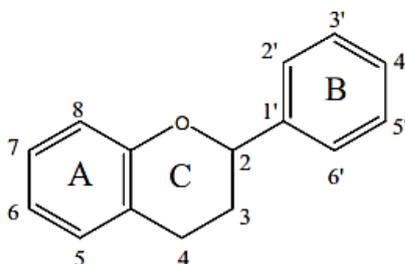


Figura 3-1. Estructura básica de los Flavonoides

Fuente: Formica et al 1995 pp. 1061-1080

Por último, esta familia de compuestos comúnmente se separa e identifica por procesos cromatográficos y por comparación de espectros frente a estándares reconocidos, siendo empleados como marcadores fitoquímicos por el hecho de poder ser detectados en la mayoría de

las especies de vegetales estudiadas y por presentar una gran estabilidad. (Waksmundzka, M. et al, 2008 pp. 84) En este aspecto se puede mencionar a uno de los flavonoides de tipo flavonol, más estudiado para estos fines, llamado Quercetina, que en su estado natural se encuentra en un sin número de plantas y frutos y generalmente como O-glucósido. Figura 4-1. Al cual se le atribuye propiedades como en la prevención de úlceras, eliminación de radicales libres, además como un anti espasmódico, antihepatotóxico y antiinflamatorio (Díaz, C. Heinzen, H. 2006 p.575)

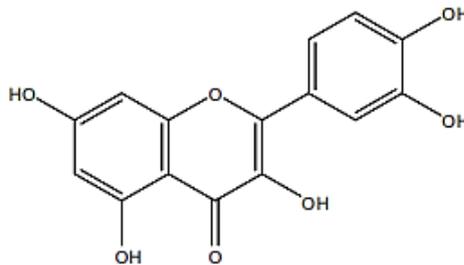


Figura 4-1. Estructura de la Quercetina

Fuente: Formica et al. 1995 pp. 1061-1080

1.3 Desarrollo de Métodos Analíticos

El propósito de desarrollar un método analítico radica en lograr consistentemente el desempeño esperado, satisfaciendo las normativas respectivas para el producto, así como los atributos de calidad que debe cumplir el mismo. (J. B. Harborne, 1973 pp. 15).

Al aplicar esto a un producto natural se debe tomar en cuenta muchos otros aspectos como definir el analito, su estructura química, biosíntesis, metabolismo y función biológica. Es por esto que para procedimientos como separación, identificación y purificación, es necesario el uso de métodos de análisis mucho más sensibles para que a su vez se cumpla con uno de los retos de la fitoquímica, que es el poder detectar cantidades más pequeñas de sustancias cada vez.

De la misma forma es importante mencionar que la falta de investigación en esta área, ha limitado a cumplir solamente con requisitos de calidad de las GMP, y es aquí donde se aprecia la importancia del avance investigativo en el campo de la fitoquímica, ya que representa una ayuda enorme en el desarrollo de métodos mucho más efectivos y validables. (J. B. Harborne, 1973 pp. 15).

1.3.1 Fases del desarrollo de métodos analíticos

Este proceso cuenta con tres fases fundamentales, donde cada una cumple un propósito y resultado específico:

- Clase de molécula a analizar (Atributos Físico-químicos y biofarmacéuticos)
- Metodología específica de análisis
- Condiciones óptimas del método (Polanco, M. 2010 p. 36)

1.3.2 Clasificación de métodos analíticos

Existen diversas formas para clasificar a los métodos analíticos como:

1.3.2.1. En función a su estado regulatorio

- *Metodologías farmacopeicas*

Son todas aquellas que ya han sido analizadas y cumplen con las especificaciones de los productos farmacéuticos determinados, bajo condiciones establecidas por las entidades de regulación (FDA y GMP) y que a su vez se encuentran descritas en las farmacopeas como la USP-NF. Además para poder emplear este tipo de metodologías, se debe de disponer de evidencia suficiente que demuestre que el método es adecuado para su uso en rutina y que consiguientemente se estandarice en un registro de verificación. No obstante si por algún motivo el método es adaptado para otro uso, este ya debe cumplir con un proceso de validación, porque se debe ajustar al nuevo propósito: (USP 40 NF 35, 2017. p.1581)

- *Metodologías no farmacopeicas*

Son aquellos que no se encuentran en los documentos farmacopeicos, por lo que deben ser correctamente validadas. (USP 40 NF 35, 2017. p.1581)

1.3.2.2. En función a su propósito analítico

Se distinguen las siguientes categorías:

- Categoría I; Aplicable a procedimientos analíticos, en la cuantificación de los compuestos principales de fármacos a granel o de principios activos en productos farmacéuticos terminados.
- Categoría II; Aplicable a procedimientos analíticos, en la determinación de impurezas o productos de degradación tanto en fármacos a granel como en productos farmacéuticos terminados. En esta categoría se puede incluir a, métodos cuantitativos y pruebas límite.

- Categoría III; Aplicable a procedimientos analíticos, en la determinación del desempeño del analito en la preparación farmacéutica.
- Categoría IV; Aplicable a procedimientos analíticos, cuyo propósito sea establecer la presencia del analito de interés. (Polanco, M. 2010 p. 57)

Tabla 3-1. Clasificación de las categorías de métodos analíticos en dependencia a su propósito en la investigación.

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de 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
Robustez	*	*	*	*	*

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Fuente: USP 40 NF 35, 2017. p.1953

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

1.3.3 Aislamiento de compuestos de una matriz vegetal

El pretratamiento de la muestra conforma uno de los más importantes y de mayor duración dentro de un proceso de análisis, ya que debe priorizar una extracción de bajo costo, efectiva, con el uso mínimo de solventes y sobretodo garantizar el grado de recuperación del compuesto de interés. (Heinrich, M. et al, 2012 pp.109).

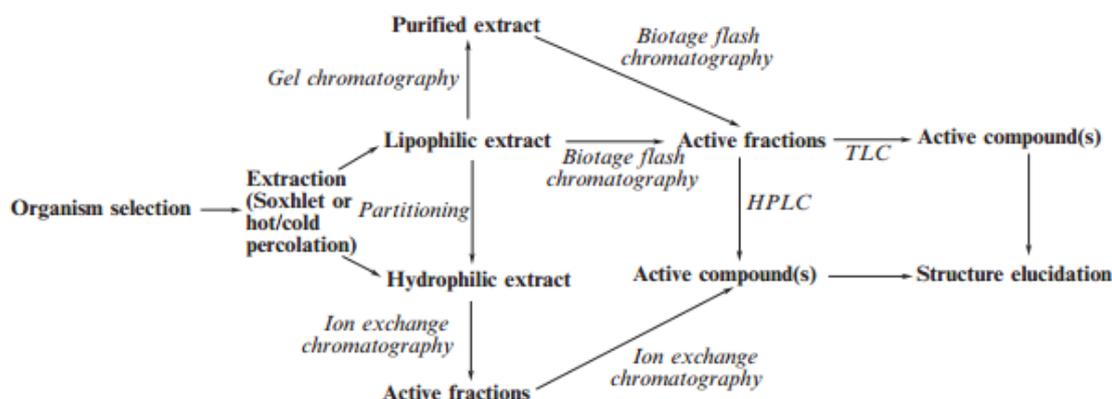


Figura 5-1. Estrategia general de aislamiento de compuestos bioactivos.

Fuente: Heinrich, M. et al, 2012 pp.113

1.3.3.1 Técnicas de extracción de compuestos a partir de materia vegetal

El establecimiento del compuesto de interés, es vital en la selección de las posibles técnicas a emplear en su aislamiento. Un extracto una matriz compleja donde los compuestos tienden a actuar sinérgicamente, siendo recomendable clasificarlas en:

-*Compuestos Activos*: Quienes presentan una actividad farmacológica y acción directa sobre la fisiología del individuo.

-*Compuestos Marcadores*: Son sustancias que forman parte de las drogas vegetales que no presentan una relación directa sobre la actividad farmacológica del extracto. Además tienen un interés netamente orientado al control del producto, como para la evaluación de su estabilidad y de esta manera asegurar una buena calidad del mismo. El fraccionamiento del extracto también es importante en el aislamiento de familias compuestos o sustancias individuales del material vegetal. (Waksmundzka, M. et al, 2008 p. 59)

1.3.3.1.1 Extracción Líquido –Líquido (LLP)

Basada en el principio donde al agregar una sustancia entre dos líquidos inmiscibles en equilibrio, esta se esparcirá entre ambas, hasta una determinada relación entre las concentraciones de cada fase, también es importante diferenciar aquellos posibles compuestos que interfieran en el método con factores como gran tamaño molecular (lípidos, pigmentos, ceras) que se encuentran en el extracto bruto y deben ser eliminados. Además gracias a los pases de partición se genera la posibilidad de purificar las muestras previo a su análisis por distintos métodos de valoración. (Waksmundzka, M. et al, 2008 p. 47)

1.3.4 Técnicas Cromatográficas

Tuvieron su origen en 1906, donde Mikhail Tswett, un botánico ruso empleo por primera vez la expresión "cromatografía", para detallar el proceso de separación que sufrían pigmentos vegetales al pasar a través de columnas de carbonato de calcio, aplicando como solvente éter de petróleo. Logrando distinguir que cada pigmento tenía un diferente grado de separación por las diferentes capas de colores que se observaban mientras la muestra eluya. Es así como Tswett descubre la técnica moderna de cromatografía líquida, usando un líquido como fase móvil para trasladar los componentes de una muestra, sobre una columna hecha de una fase sólida. (CHROMacademy, 2015 p.2)

Considerada como el método de identificación, aislamiento y valoración de compuestos a partir de matrices complejas, por excelencia, posee un sin número de aplicaciones para la ciencia moderna y más aún en el campo investigativo de la industria farmacéutica, donde permite detectar los cambios que pueden ocurrir durante el almacenamiento de una mezcla compleja de sustancias biológicamente activas (S. West Holle, 2001, pp.665). Todo esto mediante comparaciones de los cromogramas, demostrando la presencia del compuesto de interés, además de otras sustancias que pueden potenciar el efecto farmacológico del material herbario o en el producto herbal acabado que son igualmente estables y que su contenido como conjunto permanece dentro de los límites definidos. (OMS, 2009 pp. 89-125)

1.3.4.3 Clasificación de las técnicas cromatográficas

Existen diversas formas de clasificación, debido a la amplia gama de tipos de cromatografía, destacándose de este grupo la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (CL). La primera orientada a la separación de compuestos de naturaleza gaseosa mediante el fraccionamiento de la fase estacionaria y la segunda la Cromatografía de Líquidos de mayor aceptación por gran cantidad de técnicas como la de según el Tamaño molecular, la de Intercambio Iónico, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia/HPLC hasta la cromatografía en capa delgada/TLC. Siendo esta última la preferida en años anteriores para el análisis de metabolitos secundarios en plantas, y principalmente para controlar la calidad, composición e identidad de los productos naturales y para evaluar preliminarmente la pureza de los mismos. Además las técnicas cromatográficas de manera general se pueden clasificar de la siguiente manera: Tabla 4-1. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 5).

Tabla 4-1. Clasificación general de las técnicas cromatográficas, según el tipo y fase estacionaria utilizada.

CLASIFICACIÓN GENERAL						
A. Cromatografía de gases (CG)		B. Cromatografía de líquidos (CL)		C. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS)		
<i>Cromatografía gas-líquido</i>	<i>Cromatografía gas-sólido</i>	<i>Líquido-líquido, o reparto</i>	<i>Líquido-sólido, o adsorción</i>	<i>Intercambio de Iones</i>	<i>Exclusión por tamaño</i>	<i>Afinidad</i>
Fase Estacionaria						
- Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	- Sólido	-Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	-Sólido	-Resina de intercambio iónico	-Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	-Grupo de líquidos específicos unido a una superficie sólida

Fuente: D. Skoog et al., 2008
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Con fines prácticos a su vez la Cromatografía de Líquidos se clasifica de acuerdo a la polaridad de la fase estacionaria:

-*Cromatografía de fase normal*; Donde se emplea una fase estacionaria de polaridad alta (hidrofílica) Figura 6-1 y una fase móvil de polaridad baja (hidrofóbica), por lo que se la prefiere para compuestos altamente polares. Durante la corrida el compuesto se asocia y es retenido por la fase estacionaria, por lo que emplear solventes de mayor polaridad se reduciría el tiempo de corrida. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 11)

-*Cromatografía de fase reversa*; Caracterizada por el uso de una fase estacionaria hidrófoba (químicamente unida a un soporte de sílice) y una fase móvil mucho más polar (consiste en una combinación de un solvente polar más un modificador orgánico utilizado para modificar la retención de determinados analitos). Llamada “Fase Inversa”, por ser la segunda en descubrirse, pero pese a esto es la más empleada en distintas determinaciones, proporcionando gran selectividad por la retención que tiene frente a muestras de naturaleza aromática o alifática. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 15)

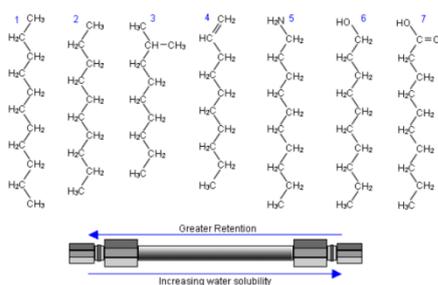


Figura 6-1. Fase estacionaria de la Cromatografía en Fase Reversa
Fuente: CHROMacademy, 2015

Para que estos procesos se lleven a cabo existe un proceso vital conocido como elución, por el cual los analitos se desplazan a lo largo de la fase estacionaria, gracias al impulso de la fase móvil. Este proceso se puede aplicar de dos formas:

- Isocrática, usa un solvente o mezcla de ellos, a la misma concentración y de manera constante durante todo la corrida.
- En gradiente, existe una variación de composición de la fase móvil a lo largo de la fase estacionaria, para lo que se debe tomar en cuenta otros factores como la columna y polaridad del eluyente. Por lo que el tiempo de la corrida se acorta, a medida que el flujo de la gradiente aumenta. (Hernández J, 2005, pp.49-59)

1.3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia - HPLC

Es la técnica más ampliamente usada en el análisis y aislamiento de productos naturales, presentando gran sensibilidad gracias a los diversos detectores a los que puede ser acoplada. Además tiene una gran capacidad para identificar las “huellas” de los extractos bioactivos y con su moderno software que permite comparar espectros UV (picos) que han sido almacenados electrónicamente, conformando una importantísima base de datos que facilitan la temprana identificación de estándares u otros compuestos previamente analizados. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 3)

Por otro lado esta técnica se convirtió en un equipo indispensable en distintas industrias ya que se encarga del control de calidad de sus productos, aparte de incursionar en un sin número de áreas. Tabla 5-1. (FALLON A. et al, 1987 p.13)

Tabla 5-1. Aplicación de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en diferentes tipos de industrias.

ÁREA	FUNCIÓN
Industria Farmacéutica	Análisis de activos (Antibióticos, esteroides, etc.)
Industria Alimenticia	Análisis de nutrientes y aditivos (proteínas, lípidos, edulcorantes, etc.)
Industria Química	Análisis de tensoactivos, colorantes, etc.
Ingeniería Ambiental	Análisis de contaminantes, fungicidas, etc.

Fuente: D. Skoog et al., 2008

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

1.3.4.2.1 Parámetros cromatográficos

1.3.4.2.1.1 Resolución (R_s)

Considerado uno de los más importantes, al condicionar al método para obtener la máxima resolución en el mínimo del tiempo, donde el valor estimado entre dos picos deber ser > 1.5 para establecer que hay una buena separación de ambos para que su área pueda ser medida con precisión. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 56).

Para el cálculo de este parámetro se toma en cuenta los picos contiguos al de interés, evaluando su nivel de separación por medio de la diferencia entre 2 veces los tiempos de retención ($t_{R2} - t_{R1}$) dividido para el área ($w_{b1} + w_{b2}$). Por lo que a medida que el tiempo de retención aumenta, disminuye la resolución, causada por la pérdida de eficiencia. (CHROMAcademy, 2015 p. 13).

1.3.4.2.1.2 Capacidad (k)

También definido como el cálculo de la retención de un analito en la columna, por lo que un valor alto de k , es un indicativo que el analito está altamente retenido e interactuando con la fase estacionaria. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 60)

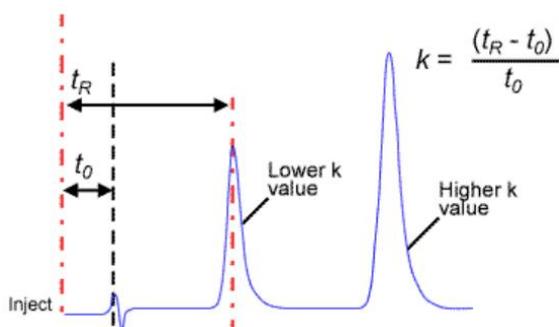


Figura 7-1. Ecuación para el cálculo de la capacidad cromatográfica.
Fuente: CHROMacademy, 2015

Para el cálculo de este parámetro se relaciona el tiempo de retención del analito (t_R) versus al del compuesto no retenido (t_0) “Tiempo muerto” (compuestos que eluye con el frente del solvente). Este parámetro a su vez puede optimizarse por medio de estrategias, siendo la más relevante la que trata de la modificación del contenido de solvente orgánico en la Fase móvil. (CHROMacademy, 2015 p. 11).

1.3.4.2.1.3 Selectividad (α)

O factor de separación, define la capacidad de un sistema cromatográfico para distinguir entre los componentes de una muestra, es medida en proporción de (k) que muestran dos picos “distancia entre ápices”

Es por esto que mientras mayor sea el valor (α), más separados están los ápices de ambos picos. Existiendo factores que condicionan la selectividad de una separación por HPLC como:

- Solvente orgánico, Cambiar de solvente (ejem. metanol a Acetonitrilo) alterará la selectividad
- pH de fase móvil, Puede alterar el grado de ionización de algunos analitos afectando su hidrofobicidad. (Pequeños cambios en el pH pueden traer acerca de grandes cambios en la retención de ciertos picos dentro el cromatograma)
- Resistencia al disolvente y aditivos, ajustar para afectar la selectividad y la retención factor (capacidad)
- Fase estacionaria, Una de las formas más populares de alterar la selectividad de un separación

- Temperatura, Puede tener un efecto con ciertos analitos en fase inversa. (CHROMacademy, 2015 p. 20)

1.3.4.2.1.4 Eficiencia (N)

Este parámetro es medido por la dispersión de un analito a medida que pasa por la columna del sistema HPLC. En una forma ideal los picos deberían ser líneas delgadas, no obstante estos efectos de dispersión hacen que estos adquieran una forma “Gaussian”. Además la eficiencia es adimensional y se representa por la letra N que representa el número de platos teóricos que a su vez simbolizan el rendimiento de la columna utilizada. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 34)

Cada plato teórico (N) es la distancia en la que los componentes logran estar en equilibrio con la fase estacionaria y la móvil. Por lo que mientras más platos teóricos, existe más equilibrio y calidad se separación en la columna. Además se calcula por la ecuación Figura 9-1. Donde t_R es el tiempo de retención del compuesto y W es el ancho del pico en su base. Por otro lado si se usan integradores electrónicos la ecuación es $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$, donde $W_{1/2}$ es el ancho del pico en la mitad de su altura. (CHROMacademy, 2015 p. 17).

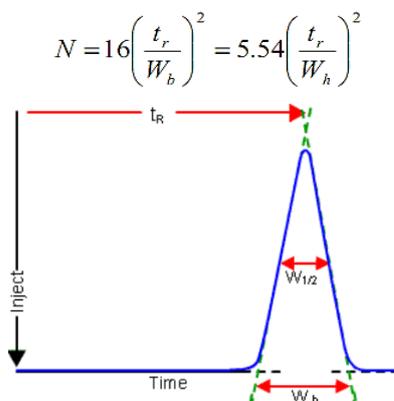


Figura 8-1. Ecuación para el cálculo de la eficiencia cromatográfica.
Fuente: CHROMacademy, 2015

Por otra parte el número de platos teóricos también se usa para establecer la eficacia de una columna en un método determinado. Por lo que a desarrollar un método de análisis, hay que controlar que se cumpla con el número de platos establecido, así como todas las condiciones operativas del mismo para que cumpla con su propósito. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 34)

1.3.4.2.1.5 Asimetría

Conocido también como “coleo”, idealmente todos los picos deberían ser simétricos o “gaussianos”, no obstante por el volumen muerto (componentes no absorbidos), otros

compuestos presentes y hasta la calidad del relleno de la columna condicionan su comportamiento ocasionando un efecto de cola. (CHROMacademy, 2015 p. 11)

Al existir asimetría en un pico es más difícil su integración por ende su cuantificación, por lo que a menudo se establecen límites de esta asimetría para que el cromatograma sea aceptado. Además este parámetro puede ser calculado de la siguiente manera; $A_s = B/A$, donde La distancia B es la más ancha y representa al ancho del pico al 5% de su altura y A que es la distancia desde el borde inicial hasta un punto ubicado al 5% de la altura del pico. (CHROMacademy, 2015 p. 12)

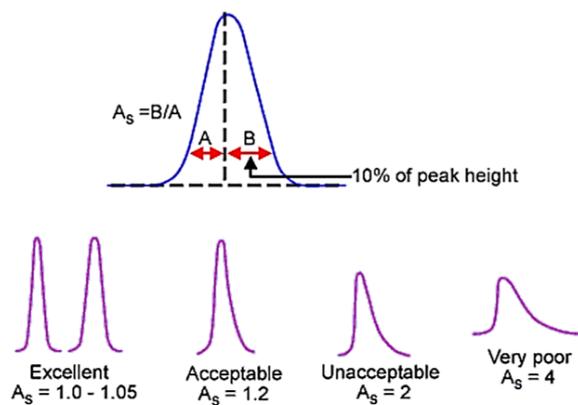


Figura 9-1. Ecuación para el cálculo de la Asimetría.
Fuente: CHROMacademy, 2015

1.3.4.2.2 Equipo

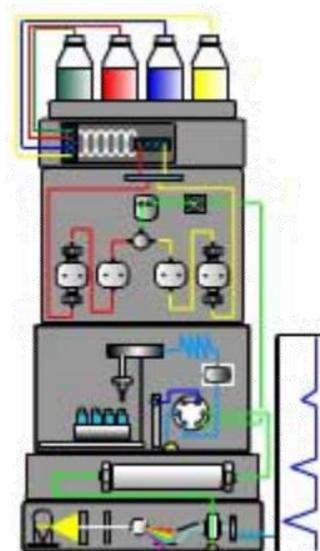


Figura 10-1. Equipo de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
Fuente: CHROMacademy, 2015

1.3.4.2.2.1 Sistema de bombeo de solventes

Este sistema fue ideado con el fin de producir un flujo preciso a altas presiones, logrando una distribución de solventes de manera eficaz y continua, sin importar la contrapresión existente. Para lo cual actualmente se emplean bombas como las cuaternarias Figura 12-1, que es capaz de mezclar hasta cuatro solventes diferentes de manera simultánea, con una bomba recíproca de doble pistón y una válvula dosificadora que controla la fracción de fase móvil para cada componente. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 71)

Además este diseño cuenta con un desgasificador que elimina aquellos gases que se pueden encontrar en los solventes, evitando interferencia en la línea base (ruido) así como un mejor rendimiento para lo que también cuenta con un software para programar las condiciones de gradiente a emplear facilitando el proceso. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 71)

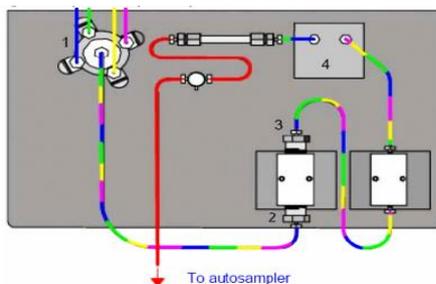


Figura 11-1. Sistema de bombas cuaternarias.
Fuente: CHROMacademy, 2015

1.3.4.2.2.2 Automuestreador

Es un nuevo sistema de inyección usado con el fin de optimizar el tiempo y número de muestras a analizar, donde la muestra es introducida en el flujo de fase móvil, sin interrumpir el flujo con la ayuda de válvulas a una presión alta que representa un paso crítico para que se tome la cantidad suficiente y evite introducir una excesiva cantidad de aire. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 82)

Además cuenta con una jeringa que perfora el tabique del vial, un dispositivo de medición de la cantidad absorbida, un dispositivo de retención (bucle de volumen fijo o ajustable), bomba de dosificación, puerto de inyección y una válvula considerada el corazón de este sistema, que controla la trayectoria y volumen del eluyente. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 82)

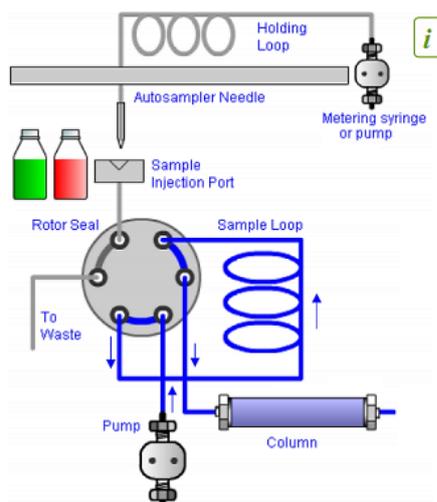


Figura 12-1. Automuestreador.
Fuente: CHROMacademy, 2015

Por otra parte este sistema es empleado en laboratorios de análisis para mejorar el rendimiento de la muestra, además de reducir así la mano de obra y sus costos asociados con la inyección manual. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 83)

1.3.4.2.2.3 Detector

Este parámetro se encuentra en plena dependencia de las propiedades físico químicas de nuestro analito, incluyendo su absorbancia, peso molecular, índice de refracción, fluorescencia, etc. Por lo que a medida que pasa la fase móvil sobre la columna, la respuesta del detector cambiará mientras que los componentes de la muestra comiencen a eludir. Entre los más ampliamente utilizados están:

- Fluorescencia
- Electroquímico
- Conductividad eléctrica
- Absorbancia de la luz Uv (visible); Bajo costos, robustez, facilidad de uso (es calculada mediante una relación lineal entre absorbancia y concentración del analito)
- Ordenamiento de Fotodiodos (PDA).- Obtiene de forma simultanea varios espectros Uv, ya que proporciona una detección a una o múltiples longitudes de onda (200-800 nm), además permite evaluar la coelución de diferentes analitos dentro de un mismo pico, mediante la aplicación de un método matemático, que compara el espectro a lo largo del pico, con el fin de determinar la cantidad de compuestos existe. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 104)

1.3.4.2.3 Componentes

1.3.4.3.1.1 Fase Estacionaria

Llamada en este caso columna conforma una de las partes fundamentales dentro de la selectividad del método, al estar en dependencia de la naturaleza química del analito. El compuesto del que está formada es la sílice utilizado con una modificación química de la superficie para la partición (fase inversa), cromatografía de intercambio iónico y de exclusión de tamaño. El sílice tiene una gran área de superficie que conduce a columnas de alta eficiencia (mayor número de interacciones con el analito - platos teóricas).

Además, el cambio de esta fase afecta directamente a la separación de los compuestos, dentro de las características fisicoquímicas de la columna se debe tomar en cuenta en la interacción con el analito y aspectos como la liofilia, polaridad o el tipo de sílice a emplear. Para la fase reversa en HPLC, se estableció tener una fase estacionaria lo menos polar que la fase móvil y estas comúnmente son:

- Octadecilsilia (C18), ya que es un hidrofóbica y altamente robusta, posee una buena retención con analito hidrofóbico (no polar) moléculas. En general, “el acortamiento de la cadena de alquilo acortar el tiempo de retención”.
- C8 que usan fases más polares, siendo capaces de interactuar con analitos polares por lo que reducen tiempos de retención y conservan su selectividad. (CHROMacademy, 2015 p. 4)

Por otro lado las columnas analíticas tienen un rango de tamaños de partículas de 3 a 10 μm de diámetro, ya que partículas de mayor tamaño presentan una resolución deficiente. Los tamaños de partícula más populares son 3.5 - 5 μm .

Cuando la distribución del tamaño de partícula no está estrechamente controlada, las partículas grandes pueden producir banda el ensanchamiento y los pequeños finos pueden bloquear las fritas de 2 μm utilizadas para retener el material de embalaje dentro del cuerpo de la columna. (CHROMacademy, 2015 p. 7)

1.3.4.3.1.2 Fase móvil

La fase móvil es la encargada de desplazar al analítico a través de la columna cromatográfica por medio de un bombeo continuo a un caudal fijo y en un sistema determinado (gradiente o Isocrática) por la bomba. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 102)

Isocrática es aquel donde la F. móvil, permanece constante en todo el análisis, para lo cual los solventes se pre mezclan en para ser colocados en una línea. O las dos mezclas se mezclan a través del uso de un sistema binario o cuaternario. Esta composición de fase móvil asegura la estabilidad del equipo, tanto en su presión, flujo y temperatura. (SNYDER, L. et al. 2010 p. 102)

Gradiente Aquí los solventes que forman la fase móvil se mezclan en una línea mediante el bombeo del sistema binario o cuaternario. Una vez introducida la muestra los solventes se relacionan y varían según lo programado en el software, en ocasiones este flujo mejora la separación de algunos compuestos. (CHROMacademy, 2015 p. 36)

Si un componente presenta una alta afinidad para la fase móvil interactuará más fácilmente con ella y su tiempo de retención será relativamente bajo. La "naturaleza" química tanto de la fase móvil como de la estacionaria puede modificarse afectando la afinidad y retención hacia un analito en particular. (CHROMacademy, 2015 p. 32)

En el caso puntual de fase reversa la separación de los compuestos de interés, los tres solventes comúnmente utilizados son: Metanol, Acetonitrilo y Tetrahidrofurano (THF), siendo de gran importancia evaluar su polaridad, acidez y basicidad para que no exista afectación en la selectividad del método. Además existen características que son indispensables para lograr la eficiencia cromatográfica como:

- Ser miscibles con el agua
- Buena solubilidad
- Baja viscosidad
- Químicamente no reactivo
- Baja detección Uv
- pH

Un punto de igual forma clave, es el pH, ya que cada compuesto ya sea ácido o base tienen una "constante de ionización" única (K_a), que especifica el grado a lo que la especie se ioniza en solución acuosa. De hecho, gracias a que las escalas de pH y pKa son logarítmicas, se puede demostrar que a 2 unidades de pH del pKa, el cambio en el grado de ionización es aproximadamente del 99%, por lo tanto, una regla conocida como 'regla de pH 2' es útil en predecir el grado de ionización. (CHROMacademy, 2015 p. 33)

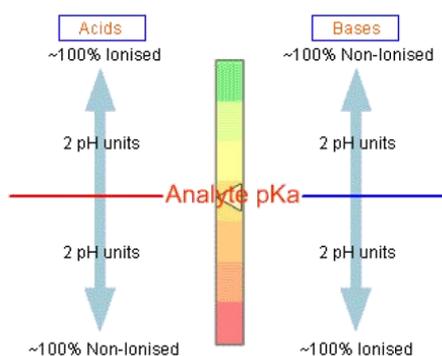


Figura 13-1. Influencia del pH en la ionización.
Fuente: CHROMacademy, 2015

Además la variación de $\pm 0,1$ unidades del pH provoca un cambio importante de la optimización de selectividad de los picos. Además se debe cumplir con las especificaciones establecidas para el método establecido. Por lo que la necesidad del uso de soluciones tampón se evidencia, ya que permiten el control de la retención tanto de ácidos como de bases débiles. (CHROMacademy, 2015 p. 33)

La concentración del buffer debe ser adecuada, para HPLC vari entre 25 a 100 mM. Los tampones preparados por debajo de 10mM pueden tener muy poco impacto en la cromatografía, mientras que aquellos en alta concentración (> 50 mM) riesgo precipitación de la sal en presencia de altas fases de concentración orgánica dañando componentes internos del sistema HPLC. (CHROMacademy, 2015 p. 34)

1.4 Validación de métodos analíticos

El concepto de *Validación* surge hace más de 20 años, por medio de los estatutos de la FDA en convenio con la ICH quienes solicitan efectuar un proceso que garantice que los métodos analíticos utilizados para evaluar productos farmacéuticos cumplan con parámetros como la precisión y exactitud, siendo confiables para la determinación de calidad del sistema. Tras el estudio de estas normas relevantes tanto para la fabricación como el control de productos farmacéuticos establecen lo hoy conocido como BMP o GMP. A esto se suman organizaciones como, EPA, OMS, Validación es la acción de probar y documentar que cualquier proceso, procedimiento o método produce de manera consistente los resultados esperados. Es decir, que se espera que los procesos sean reproducibles y que los productos cumplan consistentemente con las especificaciones establecidas. (AEFI, 2001 p. 11)

1.4.1 Consideraciones previas

1.4.1.1 Razones para realizar una validación de métodos analíticos

- Poseer documentación formal que certifique la validez del procedimiento y el cumplimiento de los criterios creados por las organizaciones regulatorias.
- Confirmar que el método analítico es adecuado para el propósito previsto
- Mitigación de errores y costo de los análisis
- Optimizar técnicas analíticas existentes para la obtención de resultados confiables
- Dar respuesta a inconvenientes
- Gracias a sus resultados se puede evaluar la calidad, confiabilidad y consistencia del análisis. (AEFI, 2001 p. 16)

1.4.1.2 Antes de empezar un proceso de validación

- Verificar que los equipos a emplear durante la validación estén correctamente calificados y/o calibrados correctamente
- Tener un método analítico establecido
- Poseer el analito en estudio correctamente caracterizado
- Contar con una planificación ordenada dentro del protocolo de validación establecido. (AEFI, 2001 p. 16)

1.4.2 Tipos de validación

1.4.2.1 Validación prospectiva

Aquella donde se define condiciones analíticas ya sea antes de la comercialización del producto o bien cuando se desarrolla un nuevo método de análisis. Para se emplea un protocolo bien planificado cumpliendo con todos los parámetros establecidos dependiendo a la categoría a la que pertenezca dicho método. En ocasiones también se emplea en procesos que han tenido algún tipo de modificación. (Polanco, M. 2010 p. 55)

1.4.2.2 Validación Retrospectiva

Esta se realiza tras un estudio de la idoneidad del método, que garantice que los datos obtenidos son confiables. Además aplica para aquellos métodos que no han sido validados con anterioridad y de los que se posee una información histórica. (Polanco, M. 2010 p. 55)

1.4.2.3 Validación Concurrente

También conocida como *Revalidación*, es aquella que se aplica en casos donde las modificaciones realizadas en el método alteran el resultado esperado. (Polanco, M. 2010 p. 55)

1.4.3 Estrategia de validación

La validación abarca varios aspectos y actividades que van a certificar la trazabilidad de los procesos y el cumplimiento de sus especificaciones, para lo cual se requiere una planificación detallada de las actividades a cumplir. Con este objeto se crea el Plan Maestro de Validación (PMV), que es un documento que presenta toda la visión del proceso de validación general dentro de una empresa. Uno de los componentes más importantes dentro de este proceso es la *calificación* (áreas, equipos, y sistemas de apoyo crítico), que busca asegurar el cumplimiento de los requisitos técnicos y operativos. (GARCÍA, E. 2001 p. 56)

Dentro del PMV se encuentra la validación de métodos analíticos, que se realizan con el uso de muestras y estándares certificados, que para su preparación, ejecución y análisis necesitan de un *protocolo* donde se contemplan todos estos y más aspectos paso a paso. Además de establecer cuáles serán los criterios de aceptación para la validación de mismo. . (GARCÍA, E. 2001 p. 58)

1.4.4 Protocolo de validación

Este documento incluye todo el proceso de validación a realizar y tiene con fin establecer por medio de ensayos de laboratorio si este es adecuado para su propósito, siguiendo cada uno de los parámetros establecidos para el método analítico en estudio en dependencia de su utilidad. (AEFI. 2001 p. 35)

1.4.4.1 Selectividad

Parámetro que hace referencia a un método que da respuestas a un grupo puntualizado de especies químicas, pero que no necesariamente pueden ser distinguidas entre sí, por lo que erróneamente se le atribuye también el nombre de Especificidad que es la capacidad de valorar de manera inequívoca un analito en presencia de componentes previsible, provenientes de degradación o de la misma matriz del producto. Por lo que la falta de especificidad de algunos métodos de análisis puede ser compensada por la implementación de análisis complementarios como: de Identificación, pureza y valoraciones. (USP 40 NF 35, 2015. p.1954)

1.4.4.2 Linealidad – rango

Señala las proporcionalidades entre la concentración del analito y su respuesta en ausencia y en presencia de una matriz, conocidas como linealidad del sistema y linealidad del método respectivamente. Para este parámetro de debe analizar un mínimo de 5 niveles de Conc., del compuesto de interés, además de recomienda realizar un pesaje individualizado y en casos de cantidades muy pequeñas se debe recurrir a diluciones. (AEFI, 2001.p.53)

Tabla 6-1. Límites de concentraciones para el intervalo de especificaciones conforme a farmacopea de los Estados Unidos USP, en dependencia del analito.

ENSAYO	INTERVALO CON RESPECTO A LA ESPECIFICACIÓN
Valoración principio activo/excipientes	80% - 120%
Valoración impurezas	50% – 120%
Uniformidad de contenido	70% - 130%
Disolución	±20%

Fuente: USP 40 NF 35, 2017

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

1.4.4.2.1 Rango

Es un parámetro de un método analítico que representa el intervalo de valores entre los niveles inferior y superior (incluidos) y que demuestran ser determinados con los parámetros antes mencionados. (AEFI, 2001 p. 56)

1.4.4.3 Exactitud

Valora el grado de concordancia entre el valor “verdadero” (conocido) y el valor obtenido tras el ensayo (resultado). Por lo que se calcula el % de recuperación en cada análisis en dependencia de la muestra a analizar. Tabla 7-1. (USP 40 NF 35, 2015. p.1959)

Tabla 7-1. Límites de concentraciones para el coeficiente de recuperación (exactitud), aceptable para productos farmacéuticos.

TIPO	COEFICIENTE DE RECUPERACIÓN (%)
Materia prima	99,0 – 101,0
Formulado farmacéutico	97,0 – 103,0
Trazas (0,1 – 10ppm)	Mínimo 90%
Trazas (< 0,1ppm)	Mínimo 75%

Fuente: AEFI, 2001 p.58

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

1.4.4.4 Precisión

Muestra el grado de concordancia (dispersión) entre una serie de medidas a partir de una muestra homogénea y en condiciones fijadas, a su vez abarca dos criterios a evaluar como la Repetibilidad, tanto del sistema como del método en las mismas condiciones y la Precisión intermedia del sistema y del método pero en esta caso en condiciones diferentes por ejemplo, como los días, analistas y/o equipo. (AEFI, 2001 p. 64)

Tabla 8-1. Límites de aceptación para el coeficiente de variación en dependencia del método de análisis y el criterio a evaluar.

PRECISIÓN (CV %)					
Métodos Cromatográficos		Métodos Espectrofotométricos y Titulación automática		Titulación Manual	
Repetibilidad	Precisión Intermedia	Repetibilidad	Precisión Intermedia	Repetibilidad	Precisión Intermedia
≤2	≤4	≤3	≤6	≤4	≤8

Fuente: USP 40 NF 35,2017

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

1.4.4.5 Robustez

Este test examina la influencia de los parámetros operacionales sobre el análisis y los resultados. Siendo necesaria la generación de un diseño experimental en el que se enfrenten diferentes factores tales como los definidos para el test de idoneidad. De forma específica para HPLC se evalúa:

- Composición de la fase móvil
- pH de fase móvil
- Flujo
- Tipo de columna
- Temperatura de la columna
- Volumen de inyección
- Detector (longitud de onda)

De todos ellos, se escoge cuales con los más críticos para nuestro método analítico y ser evaluados en un mínimo de dos niveles, utilizando el diseño antes establecido y de esa forma y con sus respectivos resultados en un gráfico superficie respuesta discernir cuales son las condiciones óptimas de para el método analítico establecido. (AEFI, 2001 p.73)

1.4.4.6 Estabilidad

La estabilidad de un compuesto está definida por su estructura, por lo que es importante identificar aquellos factores que durante el análisis puedan degradar al analito. Circunstancias que deben ser investigadas durante la validación del método analítico. Existen dos formas en las que se evalúa este parámetro, primero en función del tiempo entre la preparación de la muestra y su análisis cada 0,12 y 24 horas. Y la segunda trata de un estudio de degradación forzada, detectando las posibles sustancias degradantes del activo, para lo que la muestra es sometida a condiciones, reductoras, oxidantes, foto líticas y de variación de temperatura en un rango de tiempo determinado. (AEFI, 2001 p.73)

1.4.4.7 Límite de detección LOD & Limite de Cuantificación LOQ

Estos parámetro se encuentran dependencia del analito y su concentración dentro de la formulación, no obstante al hablar de extractos de plantas medicinales las cantidades pueden ser trazas lo que dificulta aún más la determinación de estos límites al existir además sustancias interferentes, por lo que en estos casos se debe aplicar métodos de análisis con alta selectividad y sobretodo con parámetros de aceptación mucho más amplios que en la cuestión de principios activos puros. (AEFI, 2001 p.83). De forma generalizada se establece que LOD o límite de detección se puede valorar de forma que es igual a 2 a 3 veces del ruido “promedio” mientras que LOQ, representan del 10 a 20 veces el ruido “promedio”. (AEFI, 2001 p.83)

1.4.4.8 Idoneidad del sistema

Es aquel mecanismo integral para evaluar si los sistemas cromatográficos están diseñados de forma adecuada para su propósito. Estas pruebas están basadas en el concepto de que tanto el equipo, sistema electrónico, las muestras así como las operaciones analíticas se pueden examinar bajo parámetro establecidos en la farmacopeas. Para esto se recomienda analizar las situaciones más críticas en el análisis, estableciendo un mínimo requisito en situaciones como: la desviación estándar relativa (RSD) con un máximo general del 2% (6 repeticiones), la resolución entre compuestos, que a su vez relaciona a factores como la eficiencia separación y capacidad del sistema, que permiten tener una adecuada identificación del “pico” y finalmente el factor de Asimetría, encargado de determinar si los picos son simétricos, ya que mientras más alejados de la unidad estén proporcionan valores menos confiables. Por su parte factores como el ruido, tiempos de retención, área y capacidad también pueden ser evaluados. (USP 40 NF 35, 2015. p. 587)

1.5 Esquematización del proceso

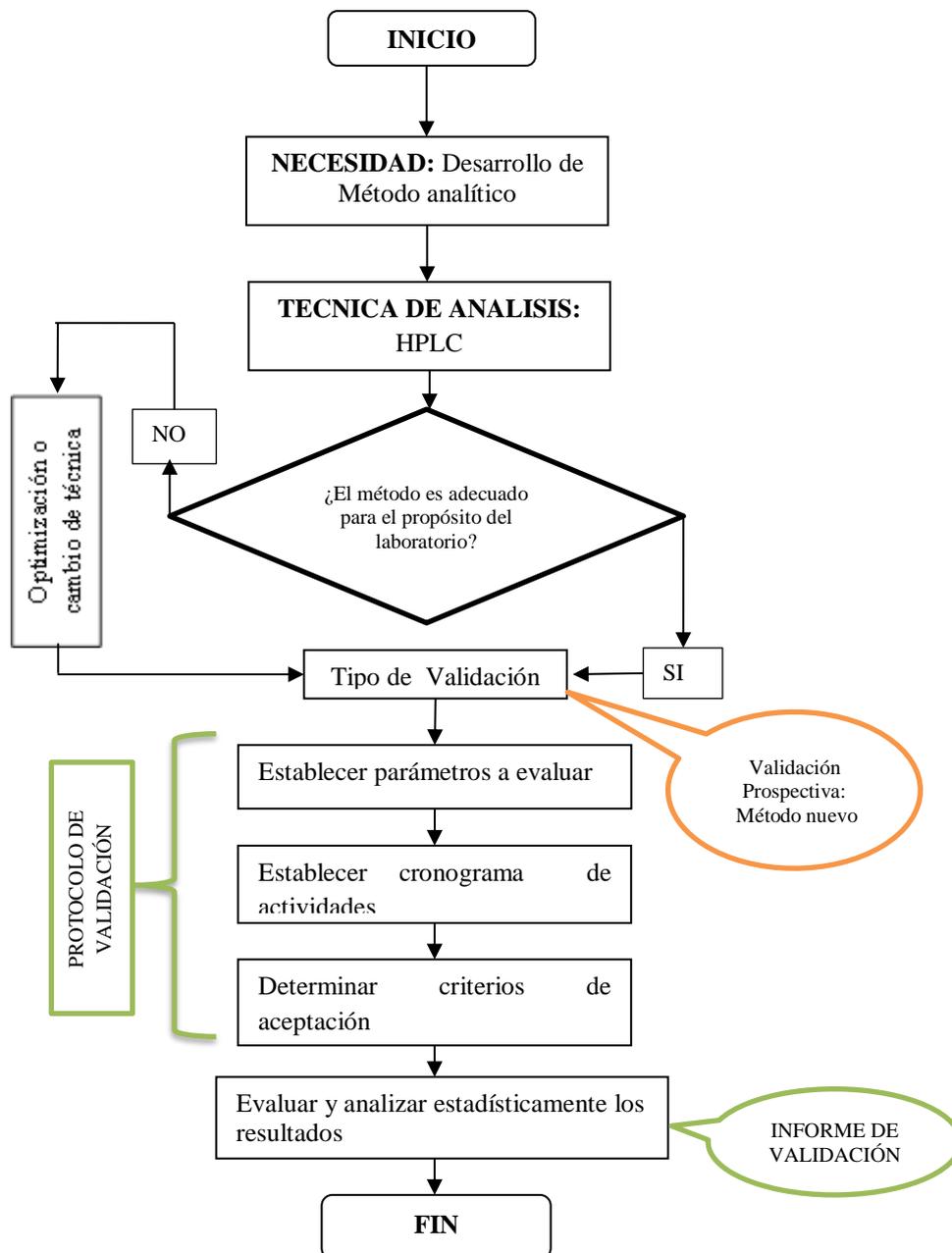


Gráfico 1-1 Esquema del proceso de desarrollo y validación del método analítico.
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

Este capítulo describe tanto el desarrollo como el proceso de validación del método analítico establecido para la determinación del marcador fitoquímico del extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM. Para lo cual se cumplió con una serie de actividades como; identificación del marcador fitoquímico, técnicas de separación del analito, optimización del método de valoración, establecimiento de las condiciones operativas para HPLC, protocolo de validación, así como el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, lo que conformara la el instructivo analítico para el producto MATICO DEL DR. PEÑA® TABLETAS, dentro del LABORATORIO NEO FARMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA.



Figura 1-2. MATICO DEL DR. PEÑA® TABLETAS
Realizado por: Melissa Fiallos L. 2018

2.1 Materiales, equipos y reactivos

2.1.1 Materiales

- Columna THERMO SCIENTIFIC® Hypersil GOLD de 150 x 4,6 y 5 μ m
- Placas cromatográficas de silica gel
- Balón de aforo
- Embudo de decantación
- Balón esmerilado
- Vaso de precipitación
- Material para reflujo
- Material para filtración de agua
- Probeta
- Pipeta Manual
- Pesa muestras de vidrio
- Gotero
- Atomizador
- Embudo
- Jeringa
- Tubo de ensayo/gradilla
- Cuba cromatográfica
- Espátula
- Trípode

- Mascarilla de gases
- Guantes de nitrilo
- Gafas
- Gasa

2.1.2 Equipos

	MARCA	MODELO
• Balanza Analítica	Sartorius	BP2105
• Pipeta electrónica	Brand	HandyStep
• HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia)	HITACHI	CROMASTER VWR
MÓDULOS Unidad Bomba	HITACHI	CM5160
Autosampler (Automuestreador)	HITACHI	CM5260
Horno-Columna	HITACHI	CM5310
Detector UV-VIS	HITACHI	CM5420
• pH-metro	METTLER TOLEDO	SevenEasy pH
• Conductímetro	METTLER TOLEDO	SevenCompact™ Conductivity S230
• Agitador Electromagnético	FISHER	210T
• Agitador Ultrasónico	VWR Scientific Products	75T
• Reverbero	UMCO	UM5505
• Cámara de luz ultravioleta	CHROMATO-VUE	CC-10
• Sorbona	WEMA Laboreinrichtungen	-----

2.1.3 Reactivos

	MARCA	LOTE
• Acetonitrilo Grado HPLC	Merck	1864530648

• Ácido Ortofosfórico	Merck	K31528373 304
• Metanol Grado HPLC	Merck	1869807703
• Trietilamina Grado HPLC	Merck	S4870452 742
• Agua Purificada Tipo I –Grado HPLC	NEO-FÁRMACO	N/A

Estándar de referencia	LOTE	% PUREZA
• Quercetina (USP)	R035PO	99,5%
• Quercetina (Working Standar)	Q0125-10G	98%

2.2 Desarrollo del método analítico

En el desarrollo de un método analítico, existe una serie de aspectos y/o etapas que se debe tomar muy en cuenta para poder cumplir con etapas:

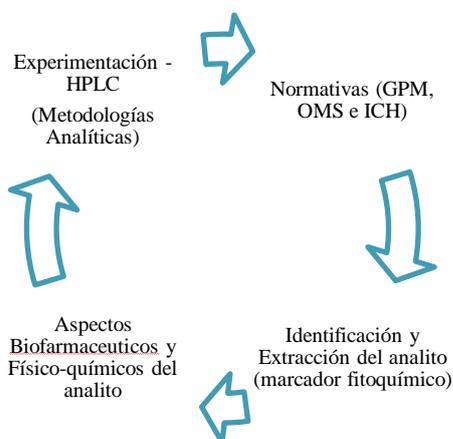


Figura 2-2. Etapas en el desarrollo de métodos analíticos
Realizado por: Melissa Fiallos L. 2018

2.2.1 Identificación del marcador fitoquímico

En base a la información previamente obtenida, comenzó el proyecto, estudiando la familia de compuestos de interés que se encontraron en el extracto. Una vez establecida se realizan pruebas comparativas con tres estándares de flavonoides conocidos (Quercetina, Luteolina y Apigenina),

frente al extracto, utilizando la técnica de la Cromatografía en capa fina, para de forma cualitativa observar cuál de ellos está presente o no en el extracto de matico.

2.3 Validación del método analítico

2.3.1 Preparación de soluciones

2.3.1.1 Preparación del estándar

Preparar el estándar de Quercetina USP a una concentración de 0,05mg/mL, utilizando como medio de disolución Metanol grado HPLC. Transferir al vial filtrando con el filtro jeringa de 0,22 μ m.

2.3.1.2 Preparación de las muestra

2.3.1.2.1 Placebo

Pesar y preparar 100g de bulk de excipientes, de acuerdo a las cantidades declaradas en la fórmula maestra de MATICO DEL DR. PEÑA® Tabletas, excepto el extracto de Matico y solventes.

2.3.1.2.2 Placebo cargado

Preparar el placebo cargado a partir de las soluciones de Estándar de Referencia y el Placebo. De la solución madre del estándar de Quercetina (0,5mg/mL) tomar 1 mL y aforar a 5mL en un balón volumétrico con la solución del placebo.

Concentración de quercetina en placebo cargado: 0,05mg/mL

2.3.1.3 Agua Purificada Tipo I (Grado HPLC)

Obtener esta agua conforme Instructivo visual (Desmineralizador E-PURE BARNSTEAD), Filtrar por membrana de 0.22 μ m.

2.3.1.4 Fase móvil HPLC

Fase móvil: Buffer Fosfato pH 2.5 / Acetonitrilo (70:30)

- Buffer Fosfato

Colocar en un vaso de precipitación el agua Tipo I, añadir ácido fosfórico, luego agregar la Trietilamina agitando constantemente la solución con el magneto, medir y ajustar el pH a 2.5 y finalmente colocar en Agua Tipo I restante y agitar con magneto por 10 min.

- *Fase Móvil*

Mezclar el volumen de Buffer Fosfato equivalente al 70% con Acetonitrilo equivalente al 30% de la fase móvil. Agitar con magneto por 10 min., filtrar por membrana de 0.22µm, desgasificar por 20 minutos y colocar en la línea correspondiente a la fase móvil en el equipo HPLC.

2.4.2 Parámetros de desempeño a evaluar

CATEGORIA I

- Selectividad
- Linealidad y Rango (Intervalo)
- Exactitud
- Precisión
 - o Repetibilidad,
 - o Precisión Intermedia
- *Robustez
- *Estabilidad
- *Idoneidad del sistema
- *Incertidumbre

2.4.2.1 *Selectividad*

Tabla 1-2. Pesos y diluciones para la realización del parámetro de selectividad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

ENSAYO: VALORACIÓN	PESOS Quercetina	[C] (mg/mL)	Nº INYECCIONES
ESTÁNDAR	Quercetina + Medio de disolución	Quercetina: 0,05 (100%)	Inyectar por sextuplicado
PLACEBO CARGADO	Quercetina + Medio de disolución	Quercetina:0,05 (100%)	Inyectar por sextuplicado
EXTRACTO DE MATICO	Flavonoides totales + Medio de disolución	Quercetina:0,05 (100%)	Inyectar por sextuplicado
PLACEBO	Bulk “excipiente” + Medio de disolución	-----	Inyectar por triplicado

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

2.4.2.2 *Linealidad y rango*

Se debe preparar las soluciones para obtener una curva de calibración a 5 niveles con las respuestas de los picos (áreas) del estándar de quercetina, para calcular la linealidad del sistema y las muestras de placebo cargado para la linealidad del método.

Intervalo con respecto a la especificación: 70-130%

Linealidad del Sistema

Estándar de Quercetina

Preparar una solución stock madre de quercetina con metanol grado HPLC a una concentración 0,5mg/mL

- De esta solución tomar alícuotas a 5 niveles (70%, 85%, 100%, 115%, 130%) y aforar con metanol grado HPLC., como se muestra en la tabla 2-2

Linealidad del Método

Placebo cargado

Preparar una solución stock madre de placebo equivalente a:

- Punto 2.3.1.1.5 + el tratamiento de la muestra (punto 2.3.1.1.2) + sol madre de. Estándar de quercetina a una concentración 0,25mg/mL
- De esta solución tomar alícuotas a 5 niveles (70%, 85%, 100%, 115%, 130%) y aforar a 5mL de *solución metanólica del placebo*. Como se muestra en la Tabla 2-2

Tabla 2-2. Pesos y diluciones del parámetro de Linealidad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

ESTÁNDAR	DILUCIONES Medio de Dilución: Metanol grado HPLC		CONCENTRACIÓN (mg/mL)	CONCENTRA- CIÓN%	N° INYECCIO- NES
	Alicuota (mL) STD MADRE QRT. 0.5 mg/mL	Aforo (mL)			
Estándar Quercetina	0,700	10	0,03500	70%	Inyectar por triplicado
	0,850	10	0,04250	85%	
	1,000	10	0,05000	100%	
	1,150	10	0,05750	115%	
	1,300	10	0,06500	130%	
Placebo Cargado	0,700	5	0,03500	70%	Inyectar por triplicado
	0,850	5	0,04250	85%	
	1,000	5	0,05000	100%	
	1,150	5	0,05750	115%	
	1,300	5	0,06500	130%	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Rango: Se efectuará el tratamiento de datos con los resultados de linealidad, conforme se detalla en el punto 2., ya que se analiza el intervalo entre niveles inferior y superior.

2.4.2.3 *Exactitud*

Se debe preparar soluciones a cinco concentraciones diferentes e inyectar por triplicado. Luego usando las respuestas de los picos de Quercetina (áreas), calcular el porcentaje de recuperación de cada análisis.

Intervalo con respecto a la especificación: 70-130%

Concentraciones: 70%, 85%, 100%, 115% y 130% según se indica en la Tabla 2-2 y calcular el porcentaje de recuperación conforme la siguiente fórmula:

$$\text{Resultado} = (r_u / r_s) \times (C_s / C_u) \times 100$$

r_u = respuesta del pico de la Solución muestra

r_s = respuesta del pico de la Solución estándar

C_s = concentración de principios activos en la Solución estándar (mg/mL)

C_u = concentración nominal de principios activos en la Solución muestra (mg/mL)

*Nota: Considerar para los cálculos el porcentaje de pureza del Estándar, porcentaje de humedad, pesos reales de estándar y muestra, concentraciones de estándar y muestra, factor de dilución y las respuestas del pico (áreas) obtenidas en el análisis.

2.4.2.4 *Precisión*

a. Repetibilidad

Repetibilidad del Sistema o Instrumental: Preparar e inyectar soluciones de estándar de Quercetina al 100% por sextuplicado

Repetibilidad del Método: Preparar e inyectar soluciones placebo cargado al 100% por sextuplicado

Pesos y diluciones: Conforme se indica en la tabla 1-2

b. Precisión Intermedia

La precisión intermedia del sistema y del método se determinará preparando las muestras conforme a la Tabla 1-2, dentro del mismo laboratorio con el mismo equipo o instrumento con dos analistas en dos días diferentes, Tabla 3-2

Tabla 3-2. Diseño experimental para la realización del parámetro de precisión intermedia. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

INSTRUMENTO	ANALISTA	DÍA	
1	A	1	2
1	B	1	2

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

2.4.2.5 Robustez

Para este ensayo, se aplicará el diseño experimental factorial de cribado, generado en el software STAT GRAPHICS, con el objeto de examinar el efecto de parámetros operacionales sobre el análisis de resultados del sobre el estándar de Quercetina Tabla 4-2.

Tabla 4-2. Pesos y diluciones para el parámetro robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

ENSAYO: VALORACIÓN	PESOS	[C] (mg/mL)	Nº INYECCIONES
Estándar	Quercetina + Medio de disolución	Quercetina:0,05	Inyectar una sola vez conforme a la Tabla 2-9

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Además, se debe definir los factores y niveles que influyen en el desarrollo del método analítico, Tabla 5-2.

Tabla 5-2. Factores y niveles de influencia para la realización del parámetro de robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Nº	FACTOR	VALOR DE CONDICIÓN ESTABLECIDA EN EL MÉTODO	NIVEL		RESPUESTAS EVALUADAS
			Bajo	Alto	
1	Temperatura Columna	40°C	37°C	43°C	Tiempo de Retención, Factor de Asimetría, Número de Platos Teóricos
2	Flujo	1mL/min	0,8 mL/min	1,2 mL/min	
3	Composición de la Fase Móvil	Buffer fosfato pH 2,5 / Acetonitrilo (70:30)	Buffer fosfato pH 2,5 / Acetonitrilo (75:25)	Buffer fosfato pH 2,5/ Acetonitrilo (65:35)	
4	Longitud de Onda	370nm	N.A	N.A	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

2.4.2.5.1 Diseño experimental

Tabla 6-2. Factores experimentales para la realización del diseño de cribado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

FACTORES	BAJO	ALTO	UNIDADES	CONTINUO
Temperatura de Columna	37.0	43.0	°C	Sí
Flujo	0,8	1,2	mL/min	Sí
Composición de Orgánico	25.0	35.0	%	Sí
Longitud de Onda	370		nm	Sí

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 7-2. Variables respuestas establecidas para el diseño experimental (unidad). Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Respuestas	Unidades
Tiempo de corrida	Min
Factor de Asimetría	N.A
Número de Platos Teóricos	N.A

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Una vez creado el diseño experimental en el software STAT GRAPHICS, se obtiene el número de corridas necesarias para el caso, siendo un total de 16 corridas entre los factores seleccionados previamente. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado.

Tabla 8-2. Combinaciones de factores y niveles para el diseño experimental. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

LONGITUD DE ONDA	TEMPERATURA DE COLUMNA	FLUJO	COMPOSICIÓN DE ORGÁNICO
<i>Nm</i>	°C	<i>mL/min</i>	%
370	37	1,2	25
370	37	1,2	35
370	37	1,2	25
370	37	0,8	25
370	37	0,8	35
370	37	1,2	35
370	37	0,8	25
370	37	0,8	35
370	43	1,2	35
370	43	1,2	25
370	43	1,2	35
370	43	0,8	35

370	43	0,8	25
370	43	1,2	25
370	43	0,8	25
370	43	0,8	35

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

2.4.2.6 Estabilidad

a. Estabilidad de la Solución: Método de Análisis de MATICO DEL DR. PEÑA TABLETAS®
 Preparar una sola solución estándar y determinar la estabilidad de la misma, en un intervalo de tiempo como se indica a continuación:

Tabla 9-2. Intervalo de tiempo para el análisis de estabilidad de la solución. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

ENSAYO: VALORACIÓN	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	MUESTREAR Y ANALIZAR		
		0 horas	12 horas	24 horas
Estándar	Ambiente (25°C)	0 horas	12 horas	24 horas

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 10-2. Pesos y diluciones para el ensayo de Estabilidad de la solución. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

ENSAYO: VALORACIÓN	PESOS	[C] (mg/mL)	Nº INYECCIONES
Estándar	Quercetina + Medio de disolución	Quercetina:0,05	Inyectar por triplicado

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

b. Degradación forzada: Para el ensayo de degradación forzada se debe preparar las soluciones conforme se indica a continuación:

Tabla 11-2. Pesos y diluciones para la realización del ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

TIPO DE DEGRADACIÓN	CONDICIONES EXPERIMENTALES	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y MUESTREO
Hidrólisis	Sln Estándar Control	25°C (ambiente)	24HORAS
	Sln. 2 de aforo + HCl 0.1M	25°C (ambiente)	

	Sln. 2 de aforo + NaOH 0.1M	25°C (ambiente)	
	Sln 2 Blanco de HCl	25°C (ambiente)	
	Sln 2 Blanco de NaOH	25°C (ambiente)	
Oxidación	Sln. 2 de aforo + H ₂ O ₂ 3%	25°C (ambiente)	24HORAS
	Sln Blanco de H ₂ O ₂	25°C (ambiente)	
	Sln Blanco de Metanol	25°C (ambiente)	
Fotolítica	Sln. 2 exposición: Luz solar directa	25°C (ambiente)	24HORAS
	Sln Blanco de metanol exposición: Luz Uv corta	25°C (ambiente)	24 HORAS
	Sln. 2 exposición: Luz Uv corta	25°C (ambiente)	24 HORAS
Térmica	Sln 2 exposición: Cambio térmico 60°C	25°C (ambiente)	24 HORAS
	Solución control – Estándar a Temperatura ambiente	25°C (ambiente)	24HORAS

Sln. : Solución

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 12-2. Pesos y diluciones de la solución control para el ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

ENSAYO: VALORACIÓN	PESOS	[C] (mg/mL)	Nº INYECCIONES
Estándar Quercetina	Quercetina + Medio de disolución	Quercetina:0,05	Inyectar una sola vez

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 13-2. Pesos y diluciones de la solución 2., para el ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

ENSAYO: VALORACIÓN	PESOS	[C] (mg/mL)	Nº INYECCIONES
Estándar Quercetina	Quercetina + Medio de disolución	Quercetina:0,05	Inyectar una sola vez

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 14-2. Pesos y diluciones de la solución blanco para el ensayo de degradación forzada. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

ENSAYO: VALORACIÓN	SOLUCIÓN	Nº INYECCIONES
Blanco	- Solución De degradación forzada (HCl, NaOH, H ₂ O ₂) - Fase Móvil + Exposición a Degradación Forzada (Luz Solar, UV, Térmica)	Inyectar una sola vez

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
 Realizado Por Melissa. Fiallos L. 2018

2.4.2.7 *Idoneidad Del Sistema (system suitability)*

Al evaluar los ensayos de SST se generará de forma automática en el equipo HPLC mediante el software evaluando los siguientes parámetros:

- Precisión del SST
- RSD según USP,
- Factor de Capacidad (k')
- Números de Platos Teóricos (N)
- Factor de Asimetría, Resolución

Método: Inyectar soluciones de estándar al 100% por 6 determinaciones.

2.4.2.8 *Incertidumbre de la medición*

Es un cálculo muchas veces obviado pero de gran importancia dentro de los análisis más aún si son de valoración, ya que indica cuales son las fuentes que generan menor certeza sobre los resultados obtenidos Figura 4-2. Para lo cual se midieron y analizaron las distintas fuentes de incertidumbre que influyen en todo el análisis, con el uso de fórmulas como:

$$u(x) = \frac{1}{\sqrt{n}} \times \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (q' - q)^2}$$

$$u(x) = \sqrt{u'A + u'B}$$

$$U = k \times U_c$$

Figura 3-2. Ecuaciones para el cálculo de la Incertidumbre de la medición.
 Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

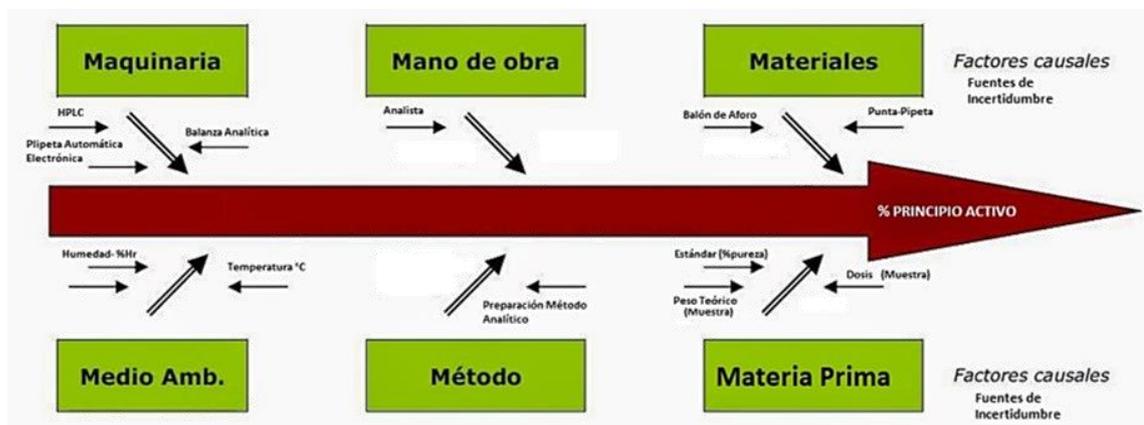


Figura 4-2. Diagrama de Ishikawa para la determinación de las fuentes de incertidumbre.
 Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

2.4.3 Registro y revisión de datos

Tabla 15-2. Criterios de aceptación en base a normativa y los resultados del proyecto. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

PARÁMETRO		CRITERIO DE ACEPTACIÓN	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO
SELECTIVIDAD	INTERFERENCIA CON EL PLACEBO	El compuesto de interés no debe presentar interferencia de otras sustancias o impurezas presentes en la formulación del producto.	CUALITATIVO
	PORCENTAJE DE DISCREPANCIA	Máximo 5%	% Discrepancia= Respuesta media placebo cargado – Respuesta media estándar) x100 / Respuesta media estándar o activo solo
	Identificación de Espectros de MATICO DEL DR. PEÑA® EXTRACO y MATICO DEL DR. PEÑA® TABLETAS Vs. Estándar de Quercetina mediante HPLC acoplado a PDA	Espectro Uv + Cronograma	CUALITATIVO
LINEALIDAD Y RANGO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	$r \geq 0.999$	ANÁLISIS DE REGRESIÓN- MÍNIMOS CUADRADOS
	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	$r^2 \geq 0.9980$	ANÁLISIS DE REGRESIÓN- MÍNIMOS CUADRADOS
	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	El coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser $\leq 5\%$ para indicar linealidad	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$ \bar{x} = valor medio de los resultados S = desviación estándar
	PENDIENTE	Correlación lineal significativa $b \neq 0$	
	INTERCEPTO	Comprobación que la recta pasa por el origen $a = 0$	
	REGRESIÓN LINEAL	Ecuación de la recta $Y = bx + a$	ANOVA -REGRESIÓN LINEAL
	HOMOGENIDAD DE VARIANZAS	p (valor): ≥ 0.05	TEST COCHRAN
	HOMOCEASTICIDAD	Sin tendencias	GRÁFICA DE RESIDUOS

	COMPARACIÓN PLACEBO CARGADO Y ESTÁNDAR	No debe existir diferencia estadística significativa entre el valor del placebo cargado y el estándar p (valor): ≥ 0.05	TEST DE t STUDENT TEST W MANN-WHITNEY TEST DE F
EXACTITUD	RECOBRO O PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	97% - 103% de la cantidad de principio activo adicionado en el placebo.	Resultado = $(ru/rs) \times (Cs/Cu) \times 100$
PRECISION.- - Repetibilidad - Precisión Intermedia	REPETIBILIDAD DEL SISTEMA O INSTRUMENTAL	Coefficiente de variación menor o igual a 2.0%.	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$ x̄= valor medio de los resultados S = desviación estándar
	REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	Coefficiente de variación menor o igual a 2.0%	
	PRECISIÓN INTERMEDIA	Coefficiente de variación menor o igual a 4.0%	
	LOS ANÁLISIS EN LABORATORIO POR DIFERENTES ANALISTAS NO DEBEN TENER EFECTO ESTADÍSTICO SIGNIFICATIVO	No debe existir diferencia estadística significativa	ANOVA
ROBUSTEZ	EVALUACIÓN DE LOS GRÁFICOS SUPERFICIE-REPUESTA PARA CONDICIONES ÓPTIMAS	Zona Caliente Zona Fría	DISEÑO FACTORIAL
ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	La diferencia absoluta de cada condición con respecto a la normal no debe exceder el RSD $\leq 20\%$ de la precisión del sistema.	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$ x̄= valor medio de los resultados S = desviación estándar
	DEGRADACIÓN FORZADA	Identificación de Degradantes y sus tiempos de retención	Cualitativo
IDONEIDAD DEL SISTEMA - (SYSTEM SUITABILITY TEST)	PRECISIÓN DEL SST	RSD $\leq 2\%$	SST SOFTWARE CLARITY SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC
	FACTOR DE CAPACIDAD	K' > 1	
	NÚMEROS DE PLATOS TEÓRICOS	N > 2000	
	FACTOR DE ASIMETRÍA	Asimetría < 2.0	
INCERTIDUMBRE	RESOLUCIÓN		INFORMATIVO
	Rs > 2.0		
	Incertidumbre combinada		
	Incertidumbre expandida		

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Este capítulo da a conocer el tratamiento estadístico de los datos, además de los resultados de cada ensayo realizado frente a criterios de aceptación establecidos. Todo esto con el fin de comprobar que el método analítico es válido para su propósito dentro del LABORATORIO NEO FÁRMACO DEL ECUADOR NEOFÁRMACO CIA. LTDA.

3.1. Resultados

3.1.1. Desarrollo del método

3.1.1.1. Marcador fitoquímico

En base a la información previamente obtenida, se estudió a la familia de los compuestos de interés que se encontraron en el extracto y que además servirán como marcador fitoquímico del mismo, cumpliendo el papel de indicador de calidad al demostrar que el producto es estable, es decir que durante el tiempo de vida útil establecido no sufre ninguna alteración en su composición, por lo que no se vería comprometida su actividad farmacológica. Una vez establecida la familia de interés en este caso los flavonoides, se obtuvieron los siguientes resultados Figura 1-3, donde se muestra la corrida en la Cromatografía en capa fina, comprobando la existencia de forma cualitativa de “Quercetina”, estableciéndolo como nuestro marcador fitoquímico, ya que se puede observar en Luz Uv-Larga, que tanto el extracto de matico como el estándar de quercetina presentan luminiscencia a la misma altura vs a los estándares de Luteolina y Apigenina que se muestran a alturas y color diferentes.

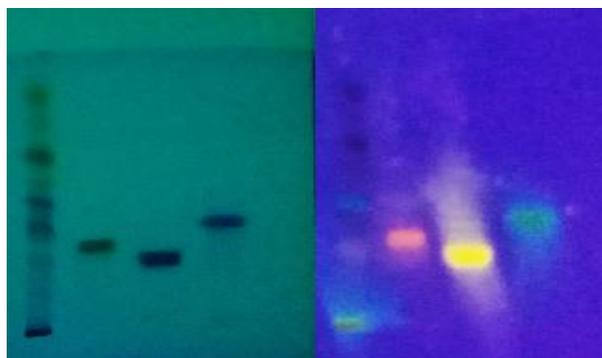


Figura 1-3. Cromatografía en capa fina (Extracto Vs. Quercetina; Luteolina; Apigenina)
Realizado por: Melissa Fiallos L. 2018

Establecido el marcador fitoquímico, conocidas sus características biofarmacéuticas, físico-químicas, los lineamientos según normativas y la técnica metodológica a emplear (HPLC), más detallada en la parte teórica del presente trabajo de investigación, se determinaron las condiciones de operación Tabla 1-3 en conjunto con la metodología de preparación de la muestra 2.3.1.2.1, conformando el método de análisis que posteriormente fue validado.

Tabla 1-3. Condiciones para el análisis por en Cromatografía líquida de alta eficiencia. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

CONDICIONES DE OPERACIÓN

Equipo:	HPLC Hitachi Chromaster, con bomba cuaternaria y desgasificación; detector UV-VIS; automuestreador; horno de columnas; software de Sistema de control y tratamiento de datos Clarity.
Fase Estacionaria:	Columna THERMO de 150 mm x 4,6 mm y 5 µm de partícula (L1)
Fase Móvil:	Buffer Fosfato: Acetonitrilo (70:30)
Flujo:	1 mL/min
Detector:	370nm
Volumen de inyección:	10µL
Temperatura de la columna:	40°C
Tiempo	25 minutos

Realizado Por Melissa C. Fiallos L. 2018

3.1.2. Validación del método

3.1.2.1. Selectividad

Tabla 2-3. Resumen de los resultados del parámetro de selectividad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	DECISIÓN
INTERFERENCIA CON EL PLACEBO	No hay pico a reportar (Anexo A)	<i>Cumple</i>
PORCENTAJE DE DISCREPANCIA	STD Quercetina (x̄= 4,4367 min) Placebo Cargado (x̄= 4,4517min)	<i>Cumple</i>

	% discrepancia: 0,3381 (Anexo A)	
IDENTIFICACIÓN EN HPLC ACOPLADO A PDA	CUALITATIVO Figura 2-3 → 5-3	<i>Cumple</i>

Realizado Por Melissa. Fiallos L. 2018

En la Tabla 2-3. se indican los resultados del parámetro Selectividad, con el primer criterio a evaluar, la Interferencia con el placebo donde, tras el análisis de la muestra (placebo cargado) se evidencio que el estándar no se vio afectado durante la corrida por la presencia del placebo, así mismo no presento ningún pico proveniente de impurezas u otras sustancias de degradación, en su mismo tiempo de retención, cumpliendo con el criterio establecido, además de demostrar eficacia del método de extracción y la selectividad del mismo.

De la misma forma, tras determinaciones realizadas a las muestras del estándar de quercetina y el placebo cargado, se obtuvieron los siguientes tiempos medios de retención de 4,4367min y 4,4517 min respectivamente, logrando un porcentaje de discrepancia del 0,338% mucho menor al máximo del criterio establecido que es del 5%, lo que señala que no existe diferencia significativa entre el tiempo de retención del estándar versus la muestra del placebo cargado, permitiendo su fácil identificación. (ANEXO A) Una forma de complementar este análisis es con la determinación de la pureza, lo que se dificulta al hablar de una matriz vegetal, por lo que gracias a la mediación de la empresa y la colaboración del Departamento de Ciencia de alimentos y Biotecnología de la Escuela Superior politécnica Nacional (EPN), se logró analizar en un equipo HPLC acoplado a un detector de ordenamiento de fotodiodos (PDA) tanto el Estándar de Quercetina Figura 2-3 y 3-3 (topograma), como la muestra de Matico Del Dr. Peña® TABLETAS Figura 4-3 y 5-3 (topograma), lo que de forma cualitativa, obteniendo como resultado el mismo pico y espectro a 4,024min y a una λ : 370,6nm en el caso del Estándar de Quercetina y a 4,022min y a una λ : 369,64nm en el caso de la muestra Matico Del Dr. Peña® TABLETAS, esto considerando la complejidad de la matriz y el tratamiento al que fue sometido la muestra refleja muy buenos resultados, que no solo habla de la selectividad sino *especificidad* del método analítico, además de asegurar la identidad y pureza de nuestro analito al medir su señal en todo el espectro de absorción en tiempo real, lo que permitió apreciar los detalles que otros detectores no ofrecen por trabajar a una longitud de onda fija.

Con todo lo antes mencionado se logra evidenciar que el método analítico desarrollado cumple con la Selectividad esperada ya que produce una señal específica y medible para el marcador fitoquímico Quercetina sin que exista interferencia de otras sustancias o excipientes.

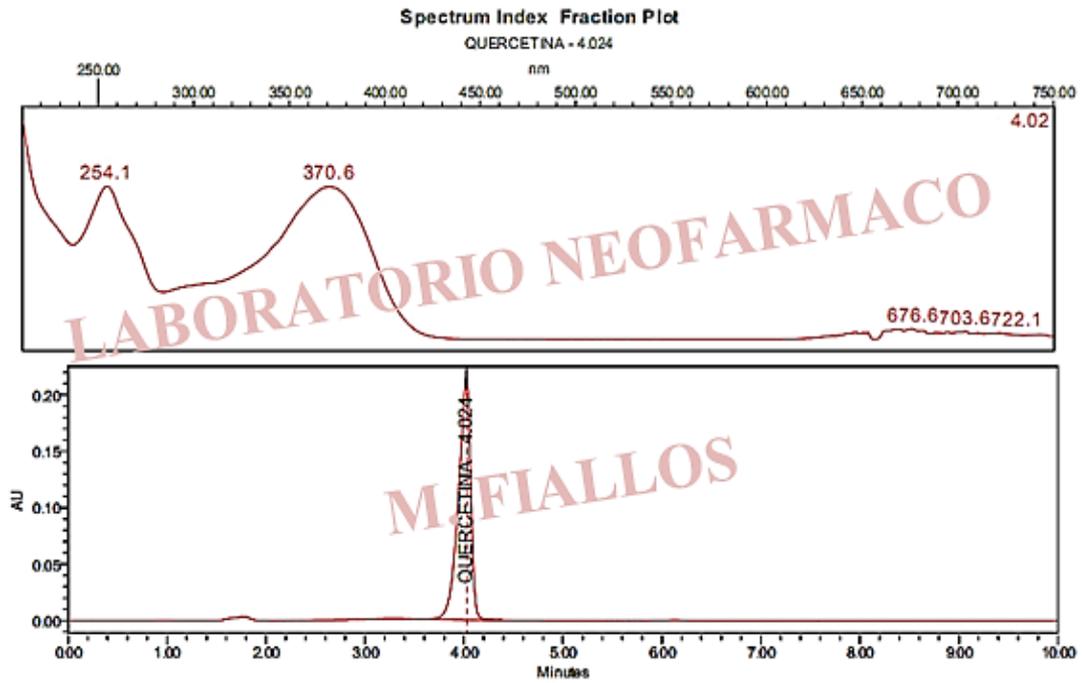


Figura 2-3. Espectro del estándar de quercetina con detector PDA
 Realizado Por: Departamento de Ciencia de alimentos y Biotecnología – EPN & Melissa Fiallos L. 2017

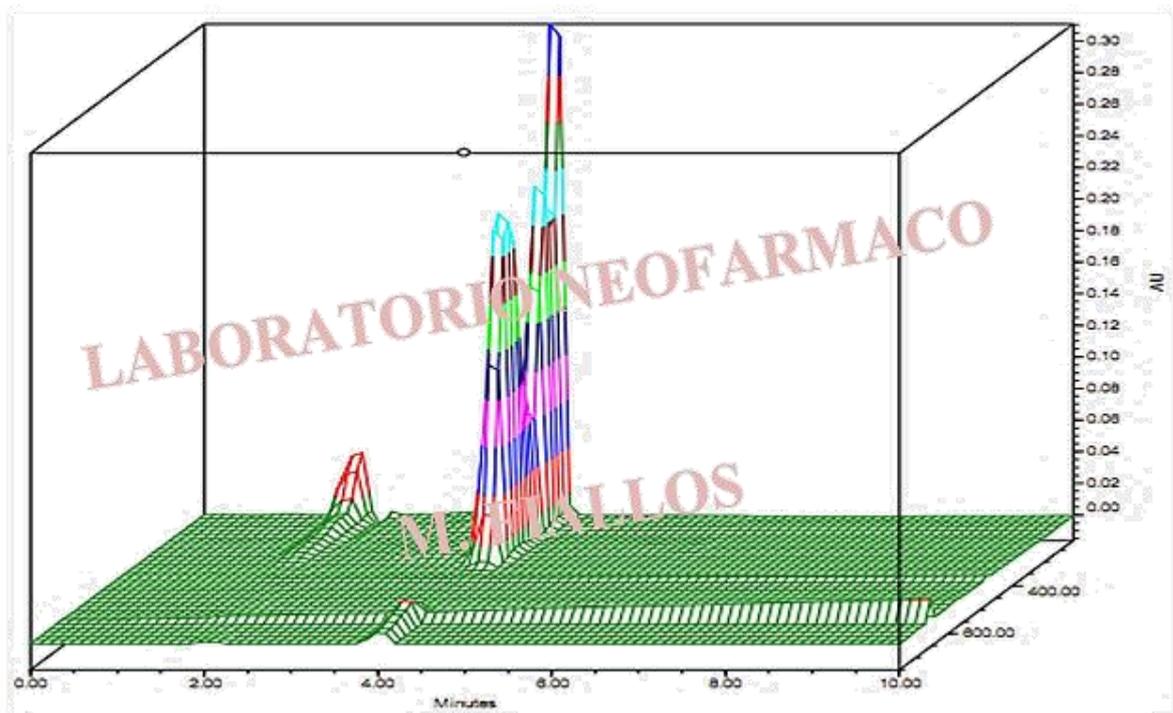


Figura 3-3. Topograma del estándar de quercetina con detector PDA
 Realizado Por: Departamento de Ciencia de alimentos y Biotecnología – EPN & Melissa Fiallos L. 2017

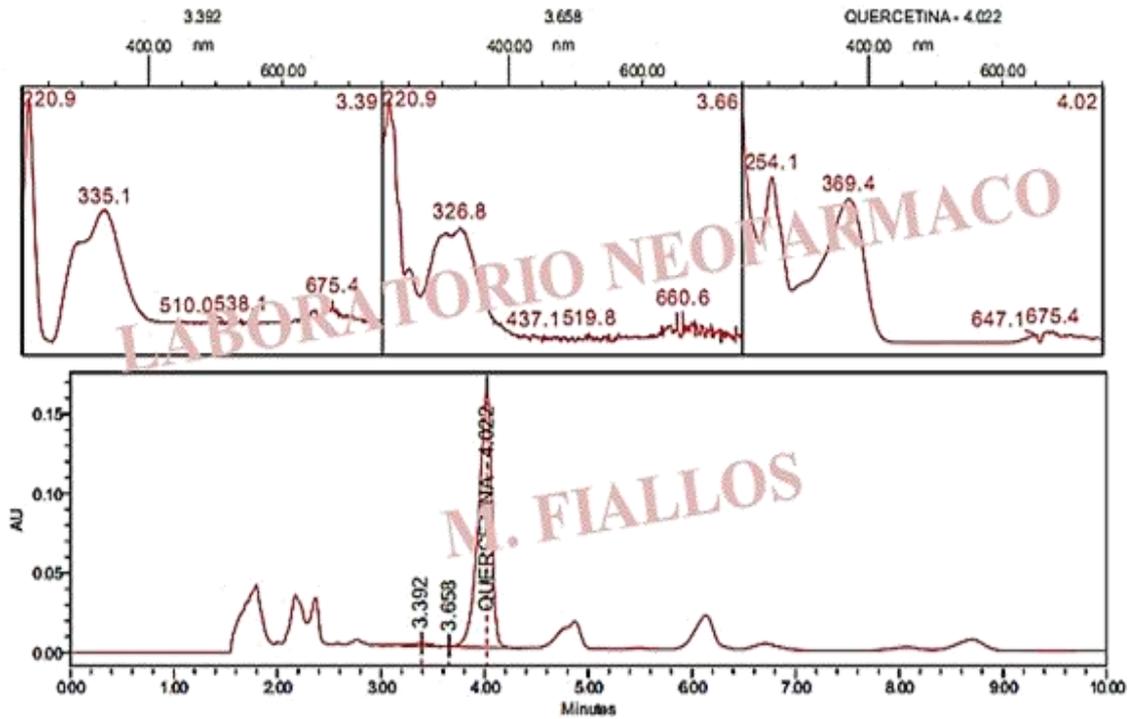


Figura 4-3. Espectros de Matico Del Dr. Peña® TABLETAS con detector PDA
 Realizado Por: Departamento de Ciencia de alimentos y Biotecnología – EPN & Melissa Fiallos L. 2017

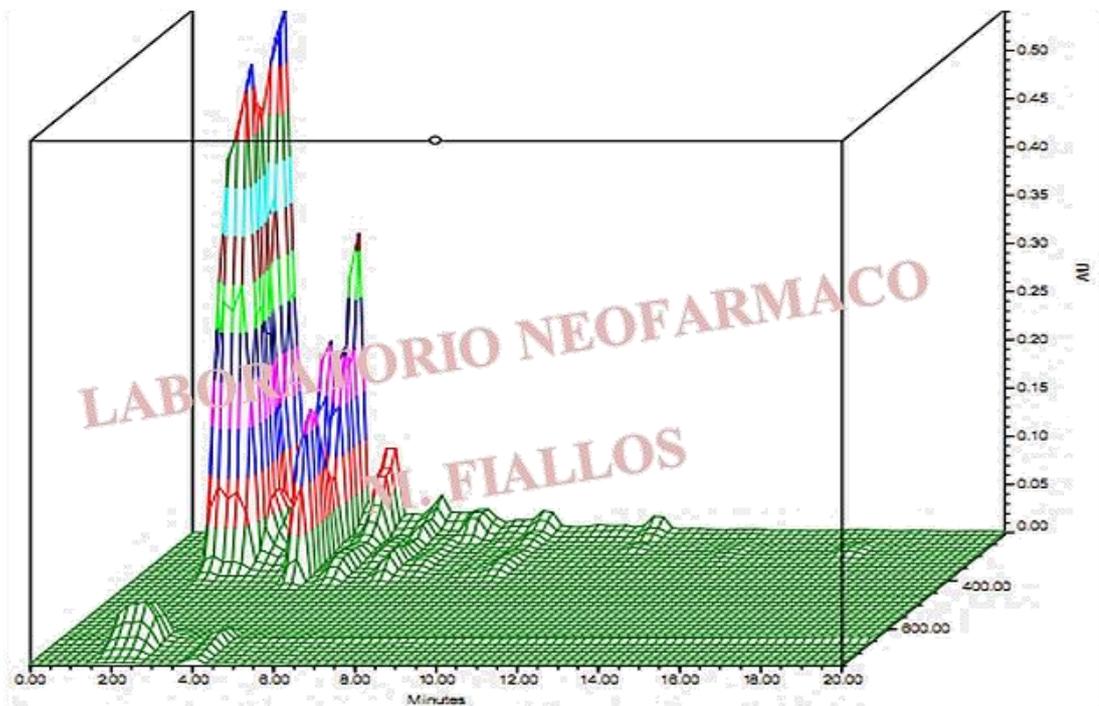


Figura 5-3. Topograma de los espectros de Matico Del Dr. Peña® TABLETAS con detector PDA.

Realizado Por: Departamento de Ciencia de alimentos y Biotecnología – EPN & Melissa Fiallos L. 2017

3.1.2.2. Linealidad y Rango

Tabla 3-3. Resumen de los resultados del parámetro de linealidad y rango. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN		RESULTADO	DECISIÓN	
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	$r \geq 0.999$	STD QUERCETINA r:0.9996394	<i>Cumple</i>	
		PLACEBO CARGADO r: 0.9995563 (ANEXO B)		
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	$r^2 \geq 0.9980$	STD QUERCETINA r^2 :0.99927893	<i>Cumple</i>	
		PLACEBO CARGADO r^2 : 0.999112797 (ANEXO B)		
COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES RESPUESTA	El coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser $\leq 5\%$ para indicar linealidad	STD QUERCETINA 0,91253417%	<i>Cumple</i>	
		PLACEBO CARGADO 1,241432579%		
PENDIENTE	Correlación lineal significativa $b \neq 0$	STD QUERCETINA b=6,2446	<i>Cumple</i>	
		PLACEBO CARGADO b=6,3928		
INTERCEPTO	Comprobación que la recta pasa por el origen $a = 0$	STD QUERCETINA a = 0	<i>Cumple</i>	
		PLACEBO CARGADO a = 0		
ANOVA	REGRESIÓN LINEAL	La regresión es estadísticamente representativa, la pendiente es distinta de 0.	STD QUERCETINA Ecuación: $Y=bx+a$ PLACEBO CARGADO Ecuación: $Y=bx+a$ (ANEXO B)	<i>Cumple</i>

	HOMEGENIDAD DE VARIANZAS	p (valor): ≥ 0.05	STD QUERCETINA Test de C de Cochran P valor: 0,191195 PLACEBO CARGADO Test de C de Cochran P valor: 0,357237	<i>Cumple</i>
	HOMOCEASTICIDAD	Sin tendencias	En la gráfica de Residuos se muestra una distribución aleatoria de los puntos, no hay tendencias.	<i>Cumple</i>
	COMPARACIÓN PLACEBO CARGADO Y ESTÁNDAR	No debe existir diferencia estadística significativa entre el valor medio del placebo cargado y el estándar p (valor): ≥ 0.05	(Test de Student) P valor: 0,789336 (Test de Whitney Wilcoxon) P valor: 0,383731 (Test de F) P valor: 0,839988	<i>Cumple</i>

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

La Tabla 3-3 detalla los resultados correspondientes al parámetro de Linealidad y Rango, siendo el primer criterio coeficiente de correlación, que con un valor de $r = 0.9996394$ para el Estándar de Quercetina y de $r = 0.9995563$ del placebo cargado, lo que indica que el método es lineal ya que cumple con lo establecido, indicando que existe correlación entre la concentración de quercetina y el área del pico (respuesta). Un criterio complementario al anterior para establecer la linealidad de un método es el del Coeficiente de determinación, que con valores de $r^2 = 0.99927893$ y $r^2 = 0.999112797$, para el estándar de Quercetina y Placebo cargado respectivamente, que cumplen con el criterio de $r^2 > 0.998$, aportando una mayor significación estadística, al representar la relación entre la variación total de la respuesta y a concentraciones determinadas.

El siguiente criterio examinado es el de coeficiente de variación de los factores respuesta, mismo que debe ser menor al 5%, para indicar linealidad ya que en una calibración lineal los factores repuesta deben estar cercanos a la pendiente y ser similares entre sí, lo que se cumple tanto en el caso del estándar de quercetina con un valor de 0,91253417% y de un 1,241432579% para el placebo cargado.

A continuación el criterio de Pendiente e intercepto los estimadores de la ordenada del origen, donde la pendiente en este caso b debe ser significativamente diferente de cero, obteniéndose como resultado para el estándar de quercetina un valor de 6,24467 y para el placebo cargado un valor de 6,39284 comprobando la correlación de los diferentes sistemas. Y el intercepto en este caso a que por su parte debe ser igual a 0, que como resultados para ambos casos tanto el estándar como el placebo cargado es igual a cero demuestra la proporcionalidad que poseen al pasar por el punto de origen y que de existir desviaciones se asumen como error aleatorio.

Con respecto a la regresión lineal, que fue empleada con el fin de examinar la relación entre las variables de estudio se obtuvieron las siguientes ecuaciones demostrando que la regresión es estadísticamente representativa y lineal, ya que la pendiente es distinta de 0 en ambos casos, tanto en el estándar de quercetina como en el placebo cargado, lo que se refleja también en la gráfica de los datos obtenidos. (ANEXO B)

En el caso de homogeneidad de varianzas, se empleó de test de Cochran, que en su estadístico Tabla 4-3, Tabla 5-3 evalúa la hipótesis de que la desviación estándar tanto en el caso de la Linealidad del Estándar del Quercetina como en Linealidad del Placebo Cargado R_p dentro de cada uno de los 5 niveles de % es la misma. Siendo de particular interés es el valor-P, que para ambos casos da como resultado un valor-P mayor que 0,05, se establece que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 4-3. Verificación de varianza de la linealidad del estándar de quercetina. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
C de Cochran	0.557792	0.191195

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
70 / 85	1.74576	0.556697	9.83408	0.1846
70 / 100	1.74576	0.317229	30.2848	0.0639
70 / 115	1.74576	0.293134	35.4681	0.0548
70 / 130	1.74576	1.38553	1.5876	0.7729
85 / 100	0.556697	0.317229	3.07957	0.4902
85 / 115	0.556697	0.293134	3.60666	0.4342
85 / 130	0.556697	1.38553	0.161439	0.2780
100 / 115	0.317229	0.293134	1.17115	0.9212
100 / 130	0.317229	1.38553	0.0524224	0.0996
115 / 130	0.293134	1.38553	0.0447613	0.0857

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 5-3. Verificación de varianza de la linealidad del placebo cargado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
C de Cochran	0.482993	0.357237

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
70 / 85	2.5722	2.00429	1.64698	0.7556
70 / 100	2.5722	0.69005	13.8947	0.1343
70 / 115	2.5722	1.08605	5.60928	0.3026
70 / 130	2.5722	1.18714	4.69468	0.3512
85 / 100	2.00429	0.69005	8.43642	0.2119
85 / 115	2.00429	1.08605	3.40579	0.4539
85 / 130	2.00429	1.18714	2.85047	0.5194
100 / 115	0.69005	1.08605	0.4037	0.5752
100 / 130	0.69005	1.18714	0.337877	0.5051
115 / 130	1.08605	1.18714	0.83695	0.9112

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

El siguiente criterio dentro del análisis de variancia es la homocedasticidad, que analiza la variación de los residuos obtenidos, por medio del Gráfico 1-3 y 2-3 del Estándar de Quercetina y del Placebo cargado respectivamente, se aprecia una distribución aleatoria de los datos sin la formación de tendencias, demostrando la que existe una distribución de amplitud de probabilidad idéntica para ambos sistemas, además de brindar mejores coeficientes estimados.

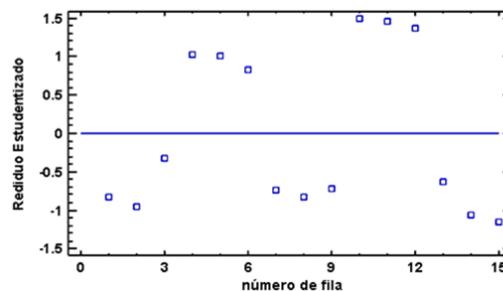


Gráfico 1-3. Gráfica de residuos – Linealidad Estándar de Quercetina
Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

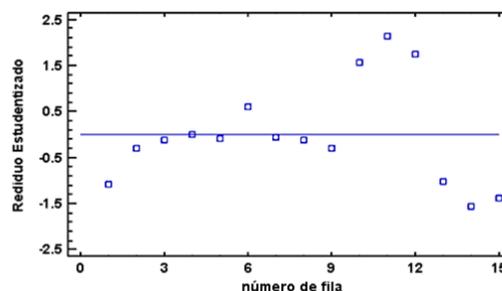


Gráfico 2-3. Gráfica de residuos – Linealidad Placebo Cargado
Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

Finalizando este parámetro con la comparación de ambos sistemas, donde tras su análisis estadístico se obtuvieron los siguientes resultados, Tabla 6-3. Estableciendo que no existe diferencia estadística significativa entre los valores del placebo cargado y el estándar de quercetina, ya que al evaluar las hipótesis específicas acerca de la diferencia entre las medias de las poblaciones de las cuales provienen las dos muestras con la prueba-t, comparar las medianas de dos muestras, ordenando los datos de menor a mayor, y comparando los rankeos promedio de las dos muestras en los datos combinados con la prueba W de Mann-Whitney y las desviaciones estándar de las poblaciones de las cuales provienen las dos muestras con la una prueba-F. Se obtiene un valor-P mayor que 0.05 en todos los casos, por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el la linealidad del Estándar de Quercetina y el Placebo cargado con un nivel del confianza del 95.0%. Además en el Gráfico 3-3 se muestra una gráfica de cuantiles, que permite observar la cercanía de la distribución de los datos del placebo cargado a la del estándar que es la ideal.

Tabla 6-3. Comparación de linealidad estándar de quercetina vs linealidad placebo cargado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

PRUEBA ESTADÍSTICA	HIPÓTESIS	RESULTADO
Prueba -t (Medias)	Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$ Hipótesis Alt.: $\text{media1} <> \text{media2}$	$t = -0.269742$ valor-P = 0.789336 No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.
Prueba W de Mann-Whitney (Medianas)	Hipótesis Nula: $\text{mediana1} = \text{mediana2}$ Hipótesis Alt.: $\text{mediana1} <> \text{mediana2}$	$W = 134.0$ valor-P = 0.383731 No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$
Prueba-F (Desviaciones Estándar)	Hipótesis Nula: $\text{sigma1} = \text{sigma2}$ Hipótesis Alt.: $\text{sigma1} <> \text{sigma2}$	$F = 0.895928$ valor-P = 0.839988 No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

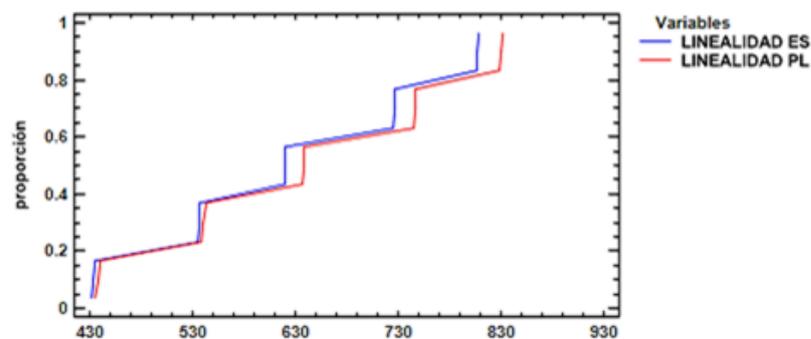


Gráfico 3-3. Esquema de Cuantiles Estándar de Quercetina vs Placebo Cargado
Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

3.1.2.3. Exactitud

Tabla 7-3. Resumen de los resultados del parámetro exactitud. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	DECISIÓN
RECOBRO O PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	102,0600%	<i>Cumple</i>

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

En la Tabla 7-3, se muestra el parámetro de Exactitud, el cual para la investigación fue estimado a través del porcentaje de recobro, que en el caso de formulaciones farmacéuticas (AEFI, 2001 p.84) es establece un límite de 97-103% del compuesto de interés, y que con un resultado de 102,0600% de recobro, permite observar que la diferencia entre la media del valor obtenido (placebo cargado) y el valor “verdadero” (Estándar) de esta dentro de los límites establecidos cumpliendo y demostrando la concordancia de los resultados obtenidos.

3.1.2.4. Precisión

Tabla 8-3. Resumen de los resultados del parámetro de Precisión. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	DECISIÓN
REPETIBILIDAD DEL SISTEMA O INSTRUMENTAL	0,302274884%	<i>Cumple</i>
REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	0,217561187%	<i>Cumple</i>
PRECISIÓN INTERMEDIA (DIFERENTES ANALISTAS)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN 2,135671% STD QUERCETINA p (valor): 0,6013 PLACEBO CARGADO p (valor): 0,0112 (ANEXO C)	<i>Cumple</i>

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

En cuanto al parámetro Precisión esta fue evaluado, en dos etapas, obteniéndose los siguientes resultados Tabla 8-3, la primera etapa fue la de la Repetibilidad tanto del sistema (Estándar de Quercetina) como del método (Placebo cargado) que con valores de 0,302274884% y

0,217561187% respectivamente, cumple con el coeficiente de variación de máximo del 2%. Estableciendo que la dispersión de las medias de los resultados obtenidos se acercan mucho al valor “verdadero” o de referencia. Además de un alto grado de concordancia entre los ensayos individuales de la muestra homogénea y en condiciones repetitivas.

Como segunda etapa se cumplió con la Precisión intermedia, realizada sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes, para lo que fue necesaria la implementación de un diseño experimental, donde se variaron los factores día y analista, permitiéndonos evaluar de manera más profunda el coeficiente de variación total del diseño obteniendo un valor de 2,135671% que se puede justificar por la volatilidad presentada por el medio de disolución (metanol), que además se encuentra dentro del límite establecido al ser menor al 4%. Y en cuanto al análisis de varianza de ambos analistas con estudio anova se obtuvieron los siguientes resultados Tabla 9-3 y 10-3.

Tabla 9-3. Análisis anova para el estándar de quercetina. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	123,838	1	123,838	0,28	0,6013
Intra grupos	9692,88	22	440,585		
Total (Corr.)	9816,71	23			

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

La Tabla 9-3 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10-3. Análisis anova para el análisis del placebo cargado. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2065,17	1	2065,17	7,66	0,0112
Intra grupos	5927,68	22	269,44		
Total (Corr.)	7992,85	23			

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

La tabla 10-3 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es mayor o igual 0,01, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 99,0% de confianza.

3.1.2.5. Robustez

Tabla 11-3. Resumen de los resultados del parámetro de robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018

CRITERIO DE ACEPTACIÓN		RESULTADO	DECISIÓN
EVALUACIÓN DE LOS GRÁFICOS SUPERFICIE-REPUESTA PARA CONDICIONES ÓPTIMAS	Zona Caliente Zona Fría Cimas Valles	Factores de Influencia: Fijo <ul style="list-style-type: none"> • LONGITUD DE ONDA (nm) Variables Respuestas Evaluadas: <ul style="list-style-type: none"> • TIEMPO DE RETENCION • FACTOR DE ASIMETRÍA • NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS 	<i>Cumple</i>
		<p>CONDICIONES ÓPTIMAS</p> <p>TIEMPO DE RETENCIÓN: Temperatura Columna 43°C Flujo 1.2 mL/min Composición de Orgánico 35%</p> <p>FACTOR DE ASIMETRÍA: Temperatura Columna 37°C Flujo:0,8 mL/min Composición de Orgánico 25%</p> <p>NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS: Temperatura Columna 37°C Flujo:0,8mL/min Composición de Orgánico 25%</p> <p>(ANEXO D)</p>	<i>Informativo</i>

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

La robustez también formo parte del proceso de validación del método analítico, donde gracias al análisis del Diagrama de Pareto estandarizado Gráfico 4-3, se estableció que el 80% de la variabilidad de los resultados del método analítico, corresponde al 20% de los factores de influencia tanto positiva como negativa, siendo el de mayor influencia, la LONGITUD DE ONDA (nm), que se define como Factor Fijo, ya que una variación o cambio en este, afecta directamente en las variables respuestas evaluadas, que en este caso son: Tiempo de retención, Factor de asimetría y Número de platos teóricos.

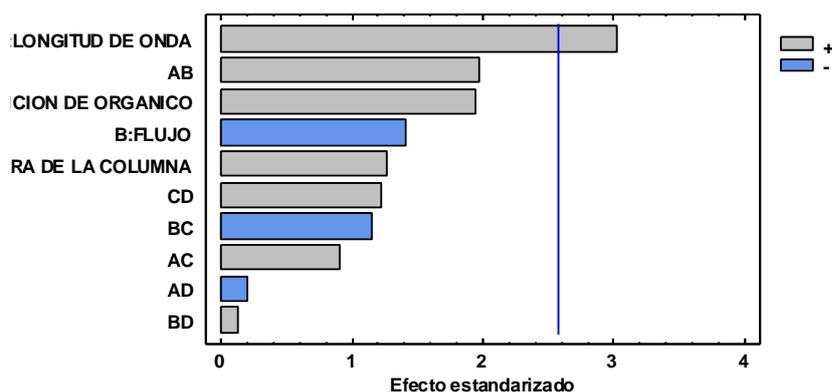


Gráfico 4-3. Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia
Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

A si mismo al mencionar o tomar en cuenta más de una variable repuesta para el análisis de robustez y sabiendo que existe más de un analito en las muestra, es necesario experimentar la influencia de cada factor sobre los parámetros o v. respuesta (principio de la ortogonalidad). Por lo que fue preciso emplear un diseño experimental factorial que proporcione un numero razonable de experimentos, optimizando el ensayo. Además en la Tabla 12-3., se muestran las estimaciones para cada efecto estimado y el factor de inflación de varianza (VIF), que demuestra que el diseño es ortogonal ya que todos los factores tienen un valor de 1.

Tabla 12-3. Estimación de los efectos de cada factor sobre las variables repuesta. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
Promedio	8758,56	362,399	
A: TEMPERATURA COLUMNA	1412,13	724,799	1,0
B: FLUJO	-1020,13	724,799	1,0
C: COMPOSICIÓN DE ORGANICO	2190,63	724,799	1,0
D: LONGITUD DE ONDA	915,625	724,799	1,0
AB	1430,88	724,799	1,0
AC	656,625	724,799	1,0
AD	-143,375	724,799	1,0
BC	-832,625	724,799	1,0
BD	92,375	724,799	1,0
CD	887,125	724,799	1,0

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

De la misma forma, mediante el empleo del software estadístico STAT GRAPHICS, se logró encontrar las condiciones óptimas para cada variable respuesta estudiada, lo con los siguientes resultados:

- *Tiempo de retención*

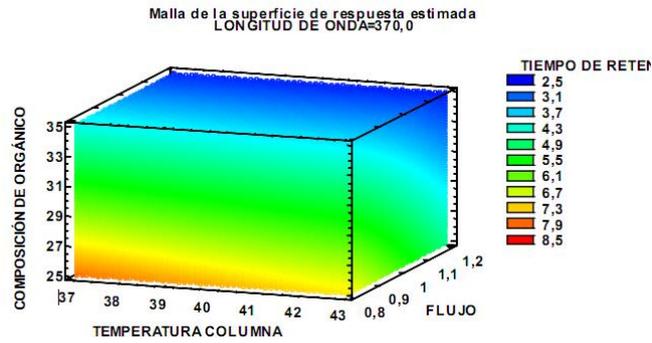


Gráfico 5-3. Malla superficie respuesta para la variable tiempo de retención.

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 13-3. Condiciones óptimas de robustez para la variable TIEMPO DE RETENCIÓN.

Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Valor óptimo = 2,61325 min

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
TEMPERATURA COLUMNA	37,0	43,0	43,0
FLUJO	0,8	1,2	1,2
COMPOSICIÓN DE ORGÁNICO	25,0	35,0	35,0
LONGITUD DE ONDA	370,0		370,0

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

La Tabla 13-3., muestra la combinación de los niveles de los factores, a la cual minimiza TIEMPO DE RETENCION sobre la región indicada. Logrando establecer el valor de uno o más factores a una constante, con sus respectivos los límites. Además gracias al gráfico 5-3 se consiguió apreciar los puntos donde el método se encuentra en la “cima y zonas frías” que formarían las condiciones óptimas de análisis, que en este caso ayuda a obtener el pico de quercetina en el menor tiempo de retención posible.

- *Factor de Asimetría*

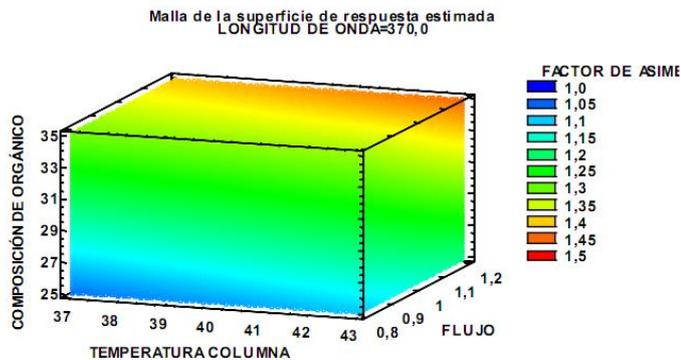


Gráfico 6-3. Malla superficie respuesta para la variable factor de asimetría.

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 14-3. Condiciones óptimas de robustez para la variable FACTOR DE ASIMETRIA. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Valor óptimo = 1,04237

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
TEMPERATURA COLUMNA	37,0	43,0	37,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
COMPOSICIÓN DE ORGÁNICO	25,0	35,0	25,0
LONGITUD DE ONDA	370,0		370,0

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

La Tabla 14-3., muestra la combinación de los niveles de los factores, a la cual se mantiene FACTOR DE ASIMETRIA en 1,0 sobre la región indicada. Logrando establecer el valor de uno o más factores a una constante, con sus respectivos los límites. Además gracias al gráfico 6-3 se consiguió apreciar los puntos donde el método se encuentra en la “cima y zonas frías” que formarían las condiciones óptimas de análisis, que en este caso ayuda a obtener el pico de quercetina simétrico con el menor factor de coleo posible.

- *Número de Platos Teóricos*

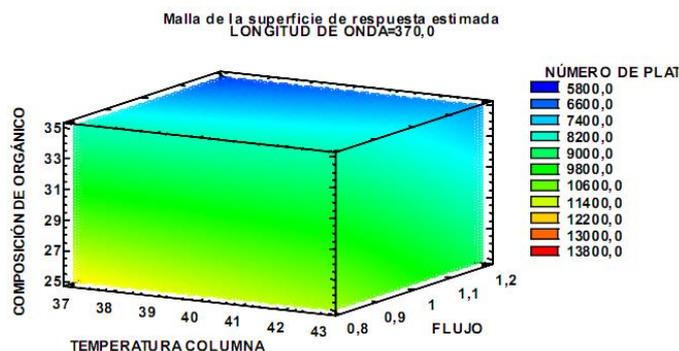


Gráfico 7-3. Malla superficie respuesta para la variable número de platos teóricos.

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

Tabla 15-3. Condiciones óptimas de robustez para la variable NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Valor óptimo = 12359,1

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
TEMPERATURA COLUMNA	37,0	43,0	37,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
COMPOSICIÓN DE ORGÁNICO	25,0	35,0	25,0
LONGITUD DE ONDA	370,0		370,0

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

La tabla 15-3., muestra la combinación de los niveles de los factores, a la cual se maximiza NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS sobre la región indicada. Logrando establecer el valor de uno o más factores a una constante, con sus respectivos los límites. Además gracias al gráfico 7-

3 se consiguió apreciar los puntos donde el método se encuentra en el “valle y zonas calientes” que formarían las condiciones óptimas de análisis, que en este caso ayuda a obtener el pico de quercetina con mayor eficiencia es decir mayor número de platos teóricos.

3.1.2.6. Estabilidad

Tabla 16-3. Resumen de los resultados del parámetro estabilidad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN		RESULTADO	DECISIÓN
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	La diferencia absoluta de cada condición con respecto a la normal no debe exceder el $RSD \leq 20\%$ de la precisión del sistema.	0 HORAS: 0,3509% 12 HORAS: 0,0259% 24 HORAS: 0,2404% (ANEXO E)	<i>Cumple</i>
DEGRADACIÓN FORZADA	Identificación de Degradantes y sus tiempos de retención	El método analítico permite distinguir entre todas las posibles especies químicas que puedan generarse en condiciones de degradación forzada en medio ácida, alcalina, oxidante, degradación térmica y foto lítica. (ANEXO E)	<i>Informativo</i>

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

Como parte del proceso de validación se propuso el parámetro de estabilidad, en la cual fue evaluada bajo dos criterios, el primero fue la estabilidad de la solución a 0 horas (en fresco), a 12 horas y a 24 horas de su preparación conservadas en las condiciones convencionales del laboratorio, obteniéndose los siguientes resultados en razón de su RSD; 0 HORAS= 0,3509%, 12 HORAS= 0,0259% y 24 HORAS= 0,2404%, cumpliendo con el limite especificado y estableciendo que la muestra es estable a las 24 horas de su preparación, no obstante debido a la volatilidad del medio de disolución (metanol), se recomienda que la preparación y análisis de la muestra sea en fresco para evitar cualquier tipo de error al procesar los datos. Por otra parte el segundo criterio fue el análisis de la muestra sometida a estrés, estudiada como degradación forzada, donde se expuso a la muestra ante agentes de degradación de carácter ácido, alcalino, oxidante, térmico y fotolítico, permitiendo distinguir a las especies químicas que pueden generarse tras esta exposición. (ANEXO E)

3.1.2.7. Idoneidad del sistema

Tabla 17-3. Resumen de los resultados del parámetro de Idoneidad del sistema. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN		RESULTADO	DECISIÓN
PRECISIÓN DEL SST	$RSD \leq 2\%$	0,776	<i>Cumple</i>
FACTOR DE CAPACIDAD	$K' > 1$	1,405	
NÚMEROS DE PLATOS TEÓRICOS	$N > 2000$	9123,242	
FACTOR DE ASIMETRÍA	Asimetría < 2.0	1,218	

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

La Tabla 17-3., se muestra los resultados del parámetro de la idoneidad de sistema que refleja el estado del sistema cromatográfico (ANEXO F), verificando si este es adecuado para el propósito del análisis. Para lo cual se determinaron criterios establecidos en AEFI, 2001 pp.106-113, como; Precisión del sst, que trata de evaluar la variación de los datos, y con un RSD de 0,776 se habla de que el método analítico estudiado tiene un alto grado de concordancia entre sus ensayos sobre una muestra homogénea.

En el caso del factor de capacidad que determina la retención del soluto, se obtuvo un valor de 1,405 que señala que el analito eluye a un tiempo de retención alejado al de la línea base, por lo que no se ve comprometida la selectividad del método.

En cuanto al número de platos teóricos como indicativo de eficiencia, se obtuvo un valor de 9123,242 lo que demuestra, tanto el buen estado de la columna cromatográfica como el de las condiciones operativas empleadas, cumpliendo por mucho con el límite establecido. Y el factor de asimetría, que muestra la adecuada distribución del pico “Campana de Gauss”, por lo que el resultado de 1,218 es un indicativo de que el pico cromatográfico tiende a ser simétrico minimizando las imprecisiones en su integración y por ende en su cuantificación.

3.1.2.8. Incertidumbre de la medición

Tabla 18-3. Resumen de los resultados de la incertidumbre de la medición. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	DECISIÓN
<i>Incertidumbre combinada</i>	μ 0,160	<i>Informativo</i>
<i>Incertidumbre expandida</i>	$U = k\mu$ 0,321	

Realizado Por Melissa Fiallos L. 2018

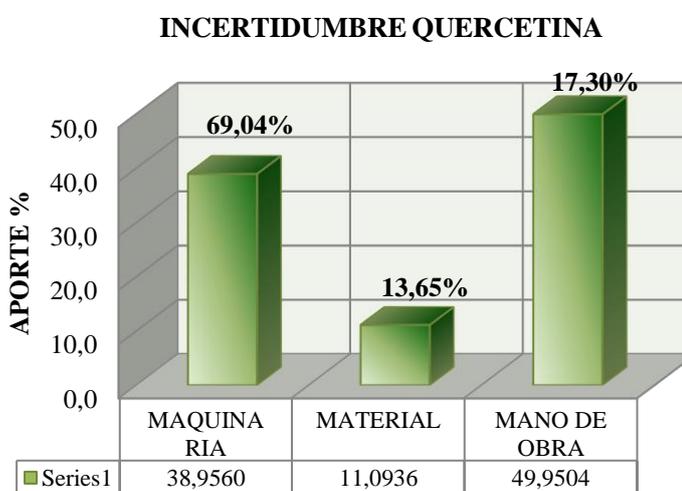


Gráfico 8-3. Representación gráfica de la evaluación de la incertidumbre de la medición.

Realizado Por: Melissa Fiallos L. 2018

Finalmente, en la Tabla 18-3 se muestra los resultados del cálculo de la incertidumbre de la medición total, que fue realizada con el fin de brindar el grado de certeza necesario para la validación del método analítico, además de servir como un informativo para posteriores análisis. Para lo cual en primera instancia se establecieron las fuentes de incertidumbre del análisis Figura 4-2 para luego de la obtención de los resultados hacer el cálculo respectivo de la incertidumbre combinada, en este caso igual 0,130 y de la incertidumbre expandida igual a 0,261. Asimismo se determinó por porcentaje que corresponde a la fuente de mayor incertidumbre que fue la de Mano de obra, es decir los analistas por lo cual se recomienda tener todo la precaución necesaria para una mejor preparación de muestra, pese a esto se evidencia que el valor que se aporta es relativamente bajo, en comparación al tratamiento que sufre la muestra en su preparación, además que al tratarse de productos naturales el criterio de aceptación es mucho más amplio.

CONCLUSIONES

- Pese a la antigüedad del empleo de plantas medicinales, en la cura de enfermedades, estas siguen siendo vitales para el desarrollo de nuevos medicamentos, ya que poseen una amplia gama de compuestos beneficiosos para nuestra salud, sin que existan las comunes reacciones adversas de los medicamentos convencionales.

- La importancia de la realización de estudios sobre productos naturales es abundante, ya que la mayoría de especies aún no han sido descritas y peor aún estudiados sus componentes químicos o bioactivos. Representado una gran fuente investigativa que impulse el desarrollo de productos innovadores con nuestros propios recursos siendo fuente de ingreso de para micro o macro empresarios.

- El empleo de técnicas avanzadas tanto en producción como en el análisis de medicamentos, facilitan el estudio de los diferentes tipos de matrices que presentan los fitomedicamentos, ya que poseen una mayor sensibilidad, es decir que son capaces de detectar cantidades de sustancias activas cada vez más pequeñas, lo que mejora continuamente y permite garantizar la seguridad y calidad de estos productos.

- Para el desarrollo de un método analítico es necesario priorizar desde la forma farmacéutica o matriz de la que se debe liberar el compuesto de interés, hasta la selección de un marcador fitoquímico que garantice la calidad del producto por medio de la estabilidad del mismo dentro de su formulación. Que en mi caso, gracias a los estudios previos y ensayos en CCF se logró establecer como a Quercetina como marcador fitoquímico del extracto de *Aristeguietia glutinosa* LAM utilizado en el producto MATICO DEL DR. PEÑA® Tabletas.

- Finalmente se logró demostrar tras el proceso de validación que el método analítico desarrollado, cumple con el propósito con el que fue creado, siendo apto para su aplicación dentro de la valoración en rutina, tanto del MATICO DEL DR. PEÑA® Extracto (materia prima), como del producto terminado MATICO DEL DR. PEÑA® Tabletas en el Laboratorio NEOFÁRMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA.

RECOMENDACIONES

- Es importante antes del desarrollo de un método analítico, conocer todos los aspectos biofarmacéuticos y fisicoquímicos del compuesto de interés ya que de esa forma se podrá establecer una técnica mucho más sensible, donde el analito sea fácilmente detectable.
- Se recomienda realizar un estudio profundo de la fase oleosa obtenida en el proceso de extracción, ya que por las características presentadas, se asume que en ella se encuentra el activo responsable de la actividad gastroprotector reportada en estudios previos.
- Se debe tomar en cuenta que al tratarse de un fitomedicamento los criterios de aceptación deben ser más amplios, en comparación a los compuestos activos o materias primas que se son aisladas con un alto grado de pureza.
- Además es trascendental concientizar el apoyo a este tipo de proyectos, tanto a nivel de la academia como a nivel de empresa privada, para que de esta forma el país potencialice el comercio de productos naturales de calidad y con menos efectos secundarios que con los medicamentos convencionales.
- La optimización de métodos analíticos dirigidos a fitomedicamentos requiere de un esfuerzo generalizado, por lo que como profesionales de la salud, se debe sugerir a las entidades regulatorias se definan especificaciones para este tipo de productos, y de esta forma incentivar la investigación de nuevas técnicas analíticas mucho más selectivas y robustas.

BIBLIOGRAFÍA

AHMED AB, ABDELWAHAB NS, ABDELRAHMAN MM et al. "Simultaneous determination of Dimenhydrinate , Cinnarizine and Cinnarizine impurity by TLC and HPLC chromatographic methods". *Bulletin of Faculty of Pharmacy , Cairo University* [en línea], 2017, (Egypt), vol. 55(1), pp. 163-169. [Consulta: 12 diciembre 2017]. ISSN 1110-0931. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110093117300042>

ALSANTE, K. M., ANDO, A., BROWN, R., ENSING, J., HATAJIK, T. D. et al. "The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products". *Advanced Drug Delivery Reviews* [en línea], 2007, vol. 59(1), pp. 29–37. [Consulta: 13 diciembre 2017]. ISSN 0169-409X/\$. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06002730>

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA (AEFI). *Validación de Métodos Analíticos*. Barcelona-España: Perkin Elmer, 2001, pp.46-130.

BACKHOUSE N., ROSALES L., APABLAZA C., ERAZO. S. et al. " Analgesic, antiinflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae". *J Ethnopharmacology* [en línea], 2008, vol 116(2), pp. 263-269. [Consulta: 19 diciembre 2017]. ISSN 0378-8741/\$. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107006204>

BAKSHI, M. AND SINGH, S. "Development of validated stability-indicating assay methods Critical review". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 2002, vol 28(6), pp. 1011–1040. [Consulta: 21 diciembre 2017]. ISSN 0731-7085/02/\$. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073170850200047X>

BLESSY, M., PATEL, R. D., PR, N. & AGR, Y. K. "Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs — A review". *Journal of Pharmaceutical Analysis* [en línea], 2014, vol 4(3), pp. 159–160. [Consulta: 23 diciembre 2017]. ISSN 2095-1779. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177913001007>

CAPRIOTTI A.L, CAVALIERE C, LAGANÀ A, PIOVESANA S, CAPRIOTTI A.L, CAVALIERE C, et al. "Recent trends in matrix solid-phase dispersion". *TRENDS Anal*

Chem [en línea], 2012, (Italy) vol 43, pp. 53-66. [Consulta: 03 enero 2018]. ISSN 00185. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993612003111>

KING R.M. & ROB H. *Aristeguietia glutinosa (Lam.)* [en línea]. Saint Louis, Missouri: H. Robinson, 2009. [Consulta: 08 enero 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/2712521?projectid=2&langid=66>

CERQUEIRA MBR, GUILHERME J.R, CALDAS S.S, MARTINS M.L, ZANELLA R, PRIMEL EG. CHEMOSPHERE. "Evaluation of the method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS / MS". *Chemosphere* [en línea], 2014, (Brazil) vol 107, pp.74–82. [Consulta: 04 enero 2018]. ISSN 0045-6535. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514003750>

CHHETA, N. , GANDHI, S. P. AND RAJPUT, S. J . "Development and validation of a stability - indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) method for atenolol and hydrochlorthiazide in bulk drug and tablet formulation", *International Journal of ChemTech Research* [en línea], 2009, (India) vol 1(3), pp. 654–662. [Consulta: 03 enero 2018]. ISSN 0974-4290. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/c05c/b02b71e24058abd3799e3b42528646b9906a.pdf>

CONCEPCIÓN-ALVAREZ A, CAMAYD-VIERA I, NUEVAS-PAZ L. "Validation of an HPLC method for total homocysteine quantification in plasma", *Revista del Laboratorio Clínico* [en línea], 2016, (Cuba) pp. 40-47. [Consulta: 06 enero 2018]. ISSN 1888-4008. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.labcli.2016.02.003>

CROZIER, A., JAGANATH, I. B. AND CLIFFORD, M. N. "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health", *Natural Product Reports* [en línea], 2009, (United States of America) vol 26(8), pp. 965-1039. [Consulta: 04 enero 2018]. ISSN 0265-0568. Disponible en: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/np/b802662a/unauth#!divAbstract>

CHROMAcademy. *The Theory Of HPLC* [en línea]. Crawford Scientific. (United States of America), 2015 [Consulta: 03 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.chromacademy.com/hplc-training.html>

DAL S, SIGRIST S, BERGAENTZLÉ M, RAMANITRAHASIMBOLA D, ANDRIAN-JARA C, MARCHIONI E. "Development and validation of a selective and effective

pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of fructosazine analogues in the ammonia treated extract of *Eugenia jambolana* Lamarck seeds", *Journal of Chromatography A* [en línea], 2016, (France) vol 1473, pp. 66-75. [Consulta: 09 enero 2018]. ISSN 0021-9673. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.035>

ELÍAS HERIBERTO, A.-N., ARMANDO JAVIER, R.-L., JOSÉ ANTONIO, V.-L. AND RUSSELL, P.-G. "Estudio comparativo entre los enfoques de diseño experimental robusto de Taguchi y tradicional en presencia de interacciones de control por control", *Ingeniería Investigación y Tecnología*. Elsevier [en línea], 2015, (Mexico) vol 16(1), pp. 131–142. [Consulta: 11 enero 2018]. ISSN 1405-7743. DOI: 10.1016/S1405-7743(15)72114-1.

EL-KAFRAWY DS, BELAL TS. "Validated HPTLC method for the simultaneous determination of cinnarizine and dimenhydrinate in their combined dosage form", *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences* [en línea], 2014, (Bahréin) vol 19, pp. 15-22. [Consulta: 13 enero 2018]. ISSN 1815-3852. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaubas.2014.06.004>

EL-SEED, H. et al. "New labdene diterpene from *Eupatorium glutinosum*", *Journal Natural Products* [en línea], 2002, (Japan) vol 65(5), pp.728-729. [Consulta: 13 enero 2018]. ISSN 223-8522. DOI:10.1021/np010595r.

FALLON A, BELL L. "Chapter 2 The theory of HPLC", *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* [en línea]. 1987, (United States Of America) vol 17, pp.8-22. [Consulta: 27 enero 2018]. ISBN: 978-0-444-80862-2. DOI: 10.1016/S0075-7535(08)70364-4.

FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, USP. *Validación de Método analíticos* <1225> USP 40 NF 35, 2015. Pp1952-1980

FERENCZI-FODOR, K., VÉGH, Z., NAGY-TURÁK, A., RENGER, B. AND ZELLER, "Validation and quality assurance of planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis", *Journal of AOAC International* [en línea], 2001,(Hungary) vol 84(4), pp. 1265–1276. [Consulta: 08 enero 2018]. ISSN 1944-7922. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/2001/00000084/00000004/art00037#expand/collapse>

GARCÍA MONTOYA, Encarnación. Optimización, Validación y Modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. [en línea] (tesis) . (Doctoral) Universitat de Barcelona, España. 2001.pp. 21-74. [Consulta: 18 enero 2018]. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/41574>

HONG, B., LIN, B. AND LIN, J. "Quantification of residential design parameters' effects on the outdoor wind environment using orthogonal experimental design (OED) and numerical simulation", *Procedia Engineering*. [en línea], 2017, (China) vol 205, pp. 137–144. [Consulta: 07 enero 2018]. ISSN 1877-7058. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705817345046>

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH), *Validation of analytical methodology*, apéndice Q2 (R1), pp. 3

JOYCE G, ANGELO T, PIRES F, Q, et al. " Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments", *Journal Chromatography B*. [en línea], 2016, (Brazil) vol 1022, pp. 81-86. [Consulta: 17 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.011>

LA BARBERA, G., CAPRIOTTI, A. L., CAVALIERE, C., MONTONE, C., SAMPERI, R., ZENEZINI CHIOZZI, R. AND LAGANÀ, A. (2017) "Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of phytochemicals in vegetal-derived food and beverages", *Food Research International*. [en línea], 2017, (Italy) vol 100(1), pp. 28–52. [Consulta: 15 enero 2018]. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.080.

LANDIM LP, FEITOZA GS, COSTA JG. "Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2013, (Brazil) vol 23(1), pp. 58–64. [Consulta: 14 enero 2018]. ISSN 0102-695X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000111>

LÓPEZ, B. G. C., SCHMIDT, E. M., EBERLIN, M. N. AND SAWAYA. "Phytochemical markers of different types of red propolis", *Food Chemistry*. [en línea], 2014, (Brazil) vol 146, pp. 174–180. [Consulta: 20 enero 2018]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.063.

MARIÑO EL, ALBERT V, FERRER MSM, MODAMIO P, LASTRA CF. "Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antirretrovirales por HPLC", *Farmacia Hospitalaria* [en línea]. 2006, (España) vol 30(6), pp.374–378. [Consulta: 22 enero 2018]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1130-6343\(06\)74009-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1130-6343(06)74009-0)

MELO MMR DE, SILVESTRE AJD, SILVA CM. Ac ce pt. "Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology", *The Journal of Supercritical Fluids* [en línea]. 2014, (Portugal) vol 92, pp. 115-176. [Consulta: 11 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas.* [en línea]. 32ª ed. Ginebra - Suiza: Organización Panamericana de la Salud, 2009 [Consulta: 23 febrero 2018] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41379/1/WHO_TRS_823_spa.pdf

ORRIOLS A, M. "A new validated method for the simultaneous determination of benzocaine, propylparaben and benzyl alcohol in a bioadhesive gel by HPLC", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea].2005, (España) vol 39(5), pp. 920–927. [Consulta: 22 enero 2018]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.05.033>

PEIXOTO MS, MONTEIRO RPM, ROLIM LA "Comparative evaluation of UV / VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*", *Brazilian Journal Pharmacognosy* [en línea]. 2013, (Brazil) vol 23(1), pp.51–57. [Consulta: 25 enero 2018]. ISSN 0102-695X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000143>

POLANCO, M. *Transferencia, verificación y validación de métodos analíticos y bioanalíticos.* [en línea]. Grupo Terrafarma. [Consulta: 15 diciembre 2017]. Disponible en: www.grupoterrafarma.com

SHABIR, G. A. "Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization", *Journal of Chromatography A* [en línea]. 2003, (Canada) vol 987(1–2), pp. 57–66. [Consulta: 28 enero 2018]. ISSN 0021-9673. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01536-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01536-4)

SHERJE, A. P. AND LONDHE, V. "Stability indicating HPLC method for determination of paliperidone in bulk", *International Journal of PharmTech Research* [en línea]. 2015, (India) vol 8(8), pp. 157–163. [Consulta: 30 enero 2018]. Disponible en: [http://sphinxsai.com/2015/ph_vol8_no8/1/\(157-163\)V8N8PT.pdf](http://sphinxsai.com/2015/ph_vol8_no8/1/(157-163)V8N8PT.pdf)

SIDDIQUI MR, ALOTHMAN ZA, RAHMAN N. "Analytical techniques in pharmaceutical analysis : A review", *Arabian Journal of Chemistry* [en línea]. 2017, (India) vol 10(1), pp. S1409–S1421. [Consulta: 31 enero 2018] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>

SKOOG D., WEST D., *Fundamentos de Química Analítica*. 4ª ed. Barcelona-España: Rever-té, 2001, pp. 831-884.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J. AND DOLAN, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. [en línea] 3ª ed. Canada: John Wiley & Sons, 2010. [Consulta: 29 enero 2018]. Disponible en: http://197.14.51.10:81/pmb/BIOLOGIE/0470167548_Chromatography.pdf.

ULRICH-MERZENICH G, ZEITLER H, JOBST D, PANEK D, VETTER H, WAGNER "Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine", *Phytomedicine* [en línea]. 2007, (Germany) vol 14(1), pp.70–82. [Consulta: 02 febrero 2018] ISSN 0944-7113. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.011>

VALENCIA, R.; PITMAN, N.; LEÓN-YÁNEZ, S.; JORGENSEN, P.M. *Libro Rojo de Las Plantas Endémicas del Ecuador*, 2ª ed. Quito-Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2011, pp. 344-359.

VARELA, J. et al. " In Vivo Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Hydro-Ethanollic Extract and Isolated Active Principles from *Aristeguietia glutinosa* and Mechanism of Action Studies", *Molecules* [en línea]. 2014, (Uruguay) vol 19(6), pp. 8488-8502. [Consulta: 05 febrero 2018] ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules19068488. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959677>

VELASTEGUÍ, J. Validación del Método Analítico de Valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC. (tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador. 2011. pp. 131-135. [Consulta: 09 febrero 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1584>

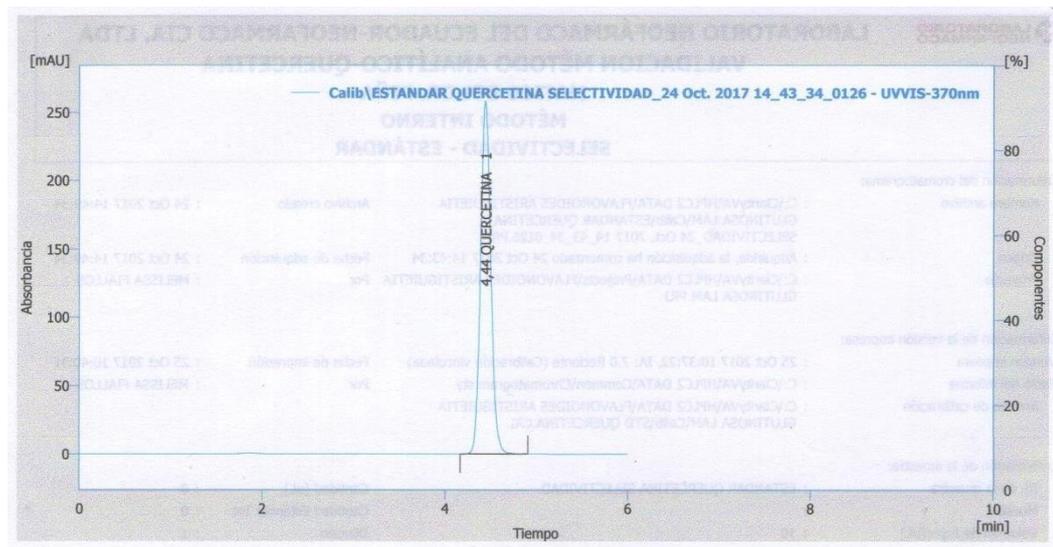
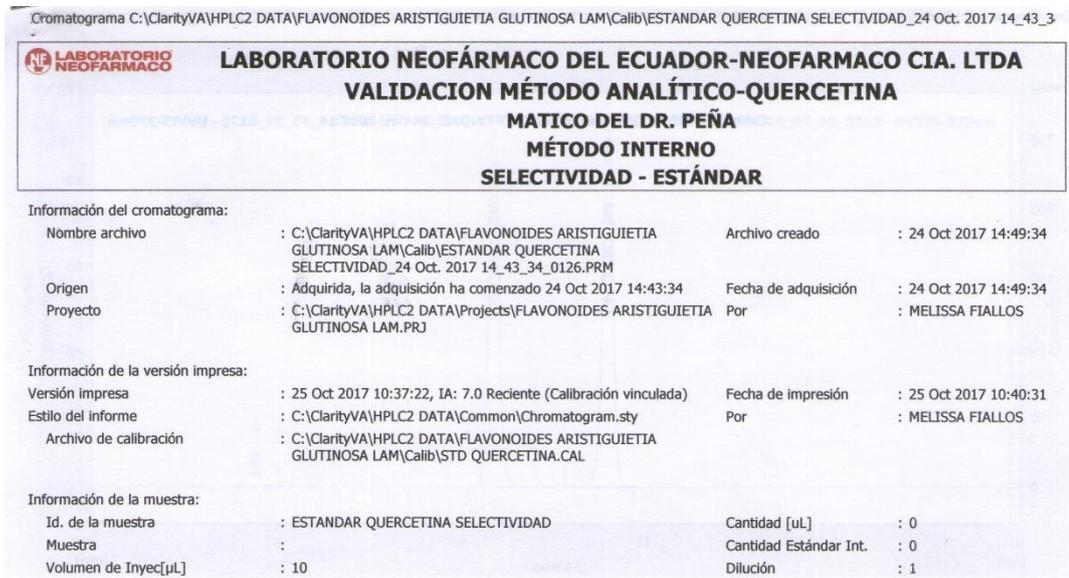
VICENTE-VICENTE, L., PRIETO, M. & MARTÍN, A. I. M. " Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio", *Revista de Toxicología* [en línea]. 2014, (Mexico) vol 30(2), pp. 171–181. [Consulta: 13 febrero 2018] Disponible en: <http://ojs.diffundit.com/index.php/revtoxicol/article/view/555>.

WAKSMUNDZKA, M. et al. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Chromatographic Science Series*. Boca Raton - United States Of America: Taylor & Francis Group, 2008, pp. 16-405

YANG M, SUN J, LU Z, CHEN G, GUAN S, LIU X, et al. " Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* [en línea]. 2009, (China) vol 1216, pp.2045–2062. [Consulta: 26 febrero 2018] ISSN 0021-9673. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.097>

ANEXOS

Anexo A. Cromatogramas correspondientes al análisis del parámetro selectividad. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.





LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
SELECTIVIDAD - PLACEBO CARGADO

Información del cromatograma:

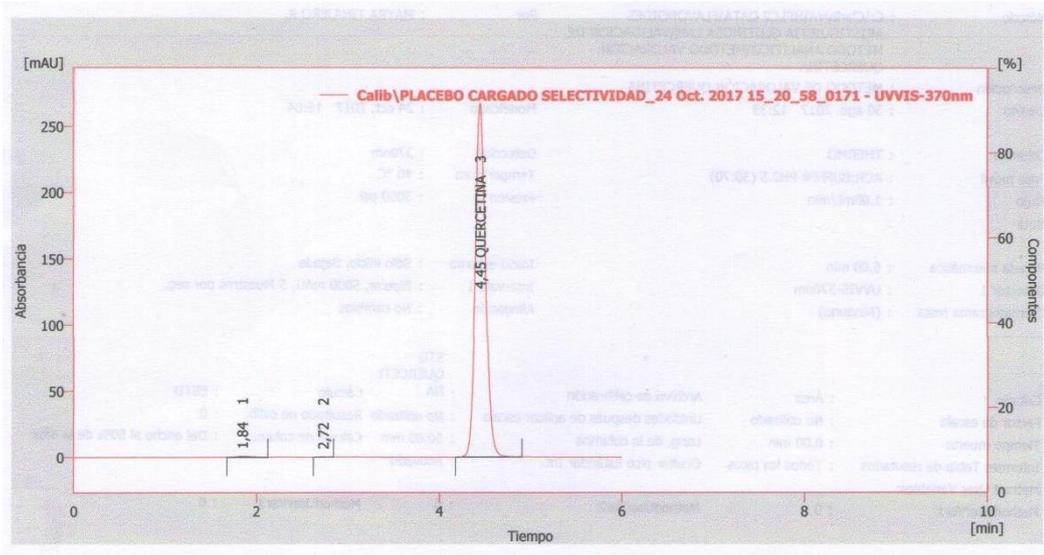
Nombre archivo	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\PLACEBO CARGADO SELECTIVIDAD_24 Oct. 2017 15_58_21_0226.PRM	Archivo creado	: 24 Oct 2017 16:04:22
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 24 Oct 2017 15:58:21	Fecha de adquisición	: 24 Oct 2017 16:04:22
Proyecto	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 24 Oct 2017 16:04:23, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 25 Oct 2017 10:44:53
Estilo del informe	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

Id. de la muestra	: PLACEBO CARGADO SELECTIVIDAD	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[μL]	: 10	Dilución	: 1





LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
PLACEBO

Información del cromatograma:

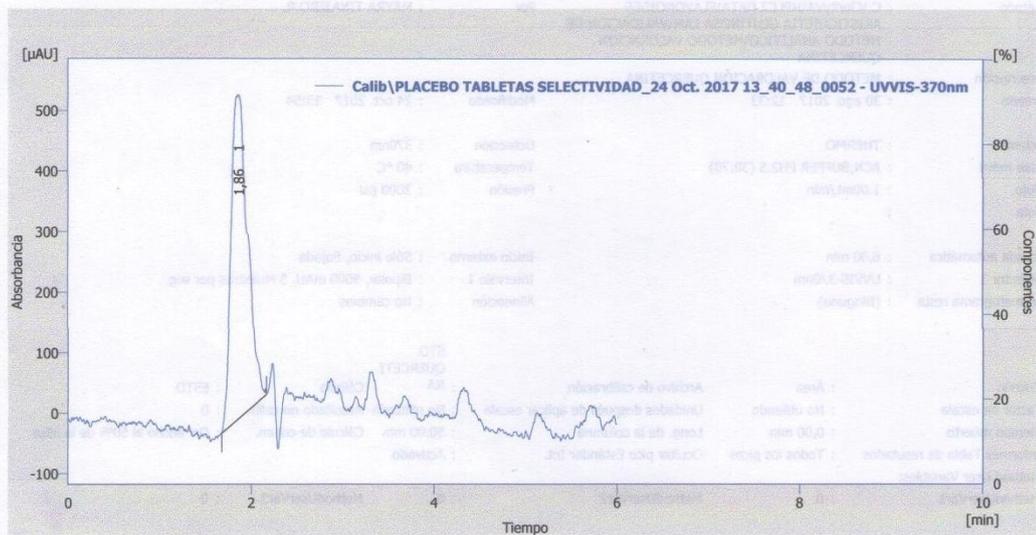
Nombre archivo	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\PLACEBO TABLETAS SELECTIVIDAD_24 Oct. 2017 13_48_17_0063.PRM	Archivo creado	: 24 Oct 2017 13:54:18
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 24 Oct 2017 13:48:17	Fecha de adquisición	: 24 Oct 2017 13:54:18
Proyecto	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 24 Oct 2017 13:54:19, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 25 Oct 2017 10:33:06
Estilo del informe	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

Id. de la muestra	: PLACEBO TABLETAS SELECTIVIDAD	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[μL]	: 10	Dilución	: 1





LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
SELECTIVIDAD - EXTRACTO

Información del cromatograma:

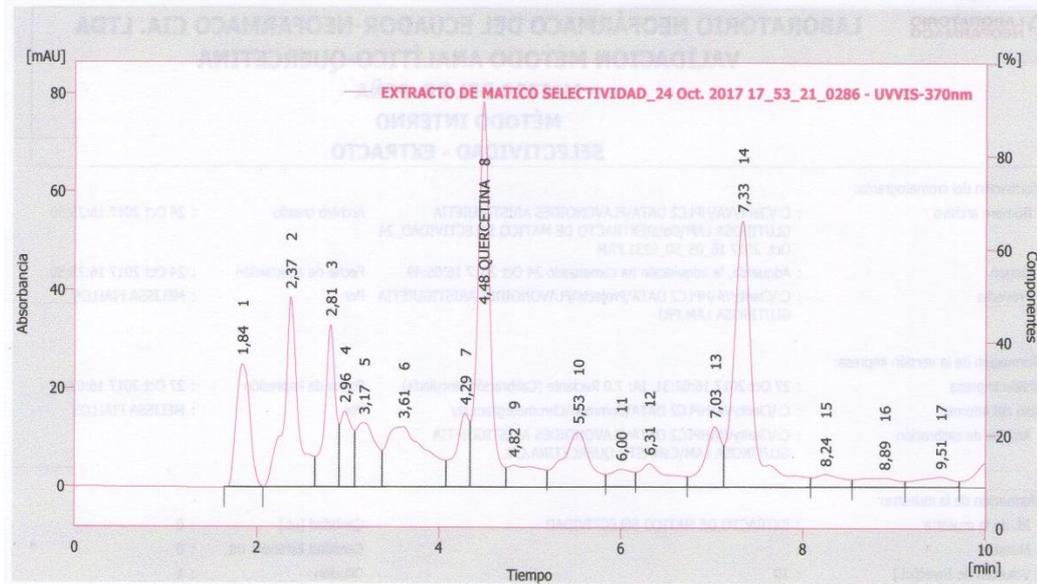
Nombre archivo	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Data\EXTRACTO DE MATICO SELECTIVIDAD_24 Oct. 2017 16_05_50_0231.PRM	Archivo creado	: 24 Oct 2017 16:25:50
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 24 Oct 2017 16:05:49	Fecha de adquisición	: 24 Oct 2017 16:25:50
Proyecto	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 27 Oct 2017 16:02:31, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 27 Oct 2017 16:03:32
Estilo del informe	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

Id. de la muestra	: EXTRACTO DE MATICO SELECTIVIDAD	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[uL]	: 10	Dilución	: 1



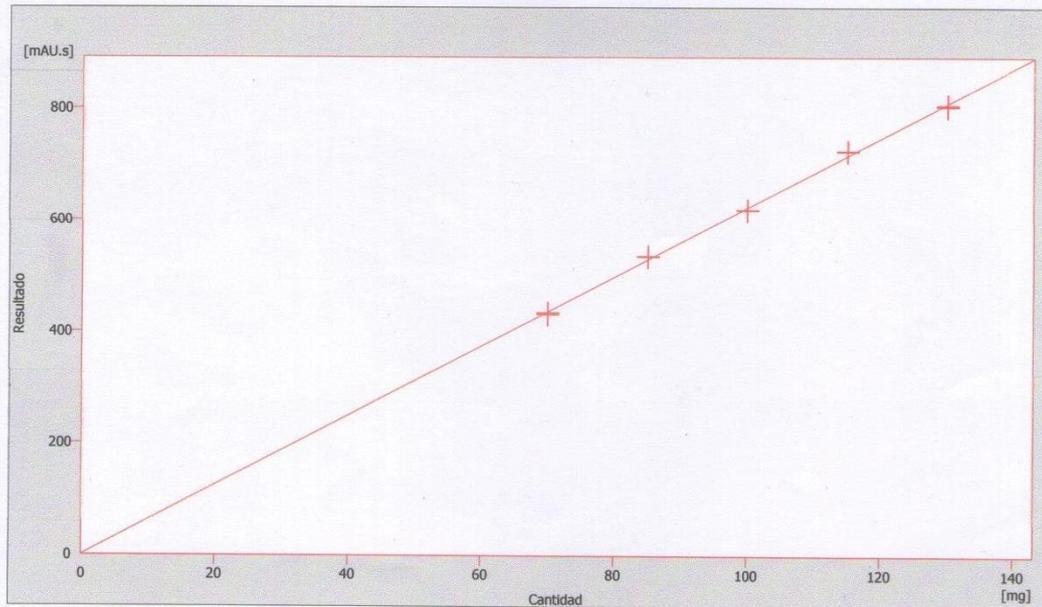
**Anexo B. Rectas de regresión correspondientes al análisis del parámetro linealidad.
Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.**

LABORATORIO NEOFARMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA.
VALIDACIÓN MÉTODO ANALÍTICO - QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
LINEALIDAD DEL SISTEMA

QUERCETINA - Señal 1 - 4,337 min

Tipo de pico : Ordnr
 Is or Uses ISTD : ---
 Margen izquierdo : 0,2 min
 Margen derecho : 0,2 min
 Criterio de cálculo : Area
 Tipo de ajuste de la curva : Lineal
 Origen : Curva desde cero
 Método de ponderación : Ninguna
 Ec. de sustitución : $Y = 6,24467 * X$
 Coeficiente de correl. : 0,9996394
 Residuo : 5,32545 [mAU.s]
 Aproximación lineal X : Ninguna
 Aproximación lineal Y : Ninguna

	Resultado	Cantidad	Factor resp.	Nº rec.	Usado
1	432,6246	70,0000	0,1618	1	<input checked="" type="checkbox"/>
2	431,9879	70,0000	0,1620	1	<input checked="" type="checkbox"/>
3	435,2793	70,0000	0,1608	1	<input checked="" type="checkbox"/>
4	536,4649	85,0000	0,1584	1	<input checked="" type="checkbox"/>
5	536,4148	85,0000	0,1585	1	<input checked="" type="checkbox"/>
6	535,7466	85,0000	0,1587	1	<input checked="" type="checkbox"/>
7	620,1950	100,0000	0,1612	1	<input checked="" type="checkbox"/>
8	619,7134	100,0000	0,1614	1	<input checked="" type="checkbox"/>
9	620,3119	100,0000	0,1612	1	<input checked="" type="checkbox"/>
10	726,1263	115,0000	0,1584	1	<input checked="" type="checkbox"/>
11	725,9613	115,0000	0,1584	1	<input checked="" type="checkbox"/>
12	725,5566	115,0000	0,1585	1	<input checked="" type="checkbox"/>
13	808,4403	130,0000	0,1608	1	<input checked="" type="checkbox"/>
14	806,2812	130,0000	0,1612	1	<input checked="" type="checkbox"/>
15	805,8565	130,0000	0,1613	1	<input checked="" type="checkbox"/>
16	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
17	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
18	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
19	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
20	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
BL	0,0000	Blanco	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>

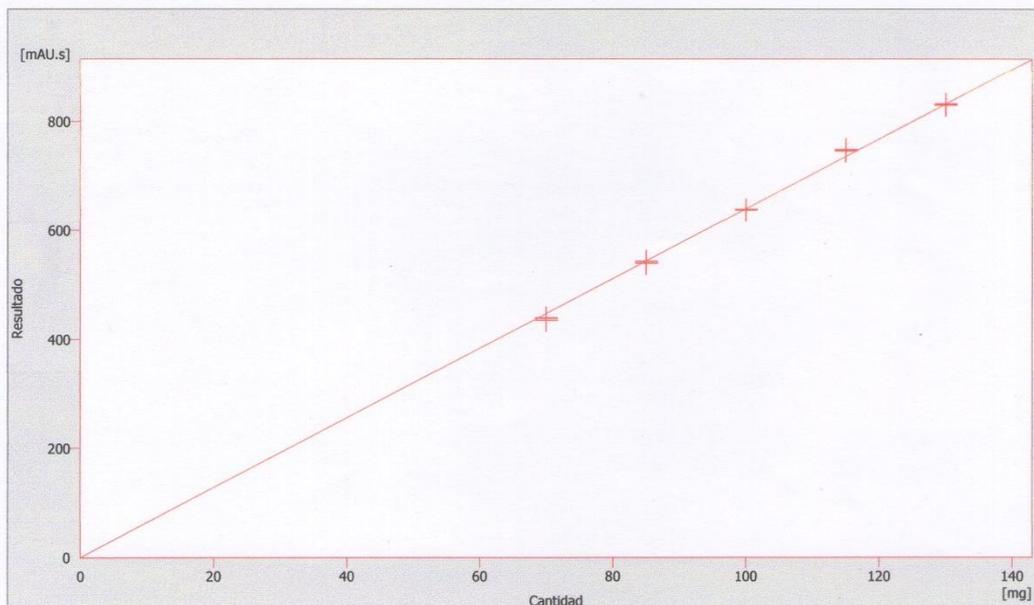


LABORATORIO NEOFARMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA.
VALIDACIÓN MÉTODO ANALÍTICO - QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
LINEALIDAD DEL METODO

QUERCETINA - Señal 1 - 4,333 min

Tipo de pico : Ordnr
 Is or Uses ISTD : ---
 Margen izquierdo : 0,2 min
 Margen derecho : 0,2 min
 Criterio de cálculo : Area
 Tipo de ajuste de la curva : Lineal
 Origen : Curva desde cero
 Método de ponderación : Ninguna
 Ec. de sustitución : $Y = 6,39284 * X$
 Coeficiente de correl. : 0,9995563
 Residuo : 6,70162 [mAU.s]
 Aproximación lineal X : Ninguna
 Aproximación lineal Y : Ninguna

	Resultado	Cantidad	Factor resp.	Nº rec.	Usado
1	434,9413	70,0000	0,1609	1	<input checked="" type="checkbox"/>
2	438,8586	70,0000	0,1595	1	<input checked="" type="checkbox"/>
3	439,7878	70,0000	0,1592	1	<input checked="" type="checkbox"/>
4	539,4383	85,0000	0,1576	1	<input checked="" type="checkbox"/>
5	538,8938	85,0000	0,1577	1	<input checked="" type="checkbox"/>
6	542,6054	85,0000	0,1567	1	<input checked="" type="checkbox"/>
7	638,0453	100,0000	0,1567	1	<input checked="" type="checkbox"/>
8	637,6249	100,0000	0,1568	1	<input checked="" type="checkbox"/>
9	636,6967	100,0000	0,1571	1	<input checked="" type="checkbox"/>
10	745,3191	115,0000	0,1543	1	<input checked="" type="checkbox"/>
11	747,4575	115,0000	0,1539	1	<input checked="" type="checkbox"/>
12	746,0582	115,0000	0,1541	1	<input checked="" type="checkbox"/>
13	831,1516	130,0000	0,1564	1	<input checked="" type="checkbox"/>
14	828,8202	130,0000	0,1568	1	<input checked="" type="checkbox"/>
15	829,5969	130,0000	0,1567	1	<input checked="" type="checkbox"/>
16	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
17	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
18	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
19	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
20	0,0000	0,0000	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>
BL	0,0000	Blanco	0,0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>



**Anexo C. Cromatogramas correspondientes al análisis del parámetro Precisión.
Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.**

Cromatograma C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA ANALISTA A DÍA 1 - PRECISIÓN INTE

LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
PRECISIÓN INTERMEDIA ESTANDAR -DIA 1- A

Información del cromatograma:

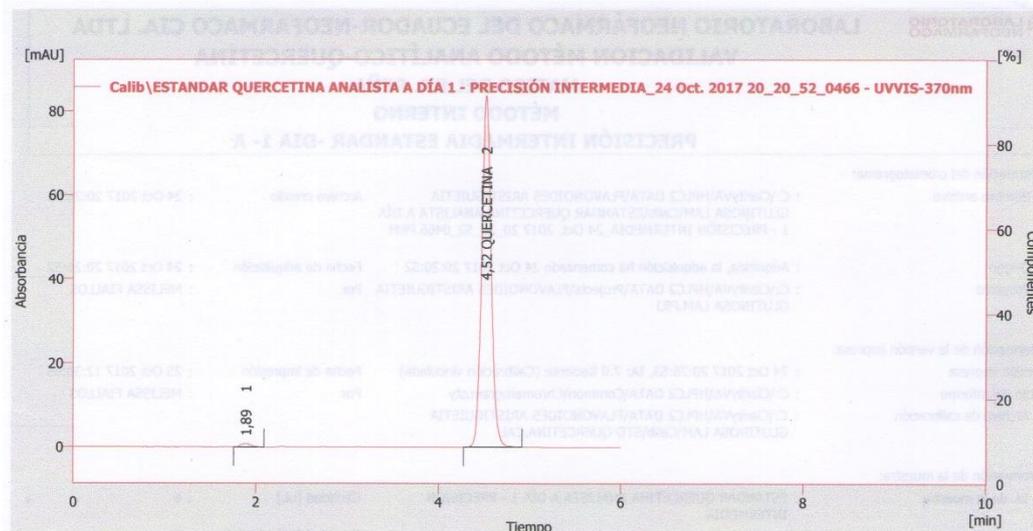
Nombre archivo	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA ANALISTA A DÍA 1 - PRECISIÓN INTERMEDIA_24 Oct. 2017 20_20_52_0466.PRM	Archivo creado	: 24 Oct 2017 20:26:53
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 24 Oct 2017 20:20:52	Fecha de adquisición	: 24 Oct 2017 20:26:52
Proyecto	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 24 Oct 2017 20:26:53, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 25 Oct 2017 12:30:05
Estilo del informe	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

Id. de la muestra	: ESTANDAR QUERCETINA ANALISTA A DÍA 1 - PRECISIÓN INTERMEDIA	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[μL]	: 3	Dilución	: 1





LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MÁTICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
PRECISIÓN INTERMADIA ESTANDAR -DIA 1- B

Información del cromatograma:

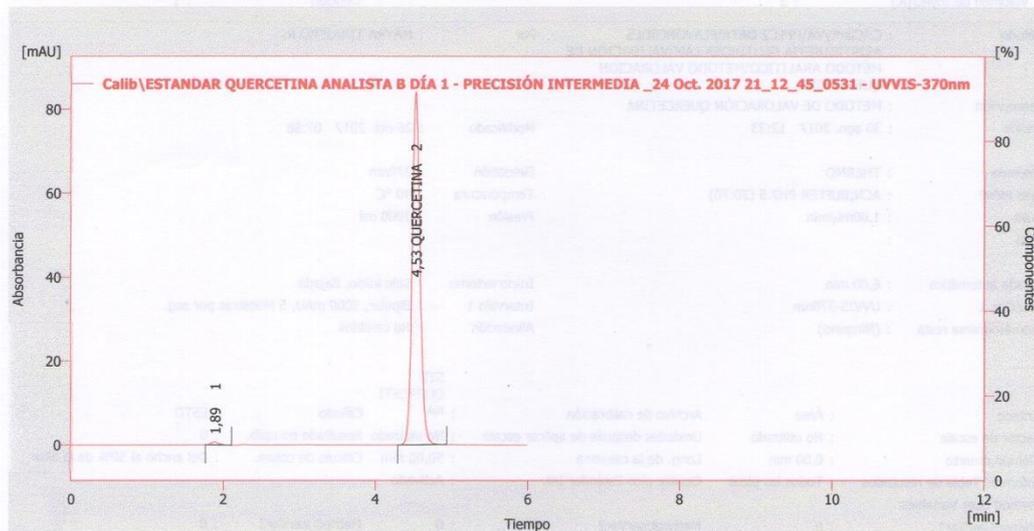
Nombre archivo	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA ANALISTA B DÍA 1 - PRECISIÓN INTERMADIA _24 Oct. 2017 21_49_0586.PRM	Archivo creado	: 24 Oct 2017 21:55:50
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 24 Oct 2017 21:49:49	Fecha de adquisición	: 24 Oct 2017 21:55:50
Proyecto	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 24 Oct 2017 21:55:51, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 26 Oct 2017 8:01:49
Estilo del informe	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

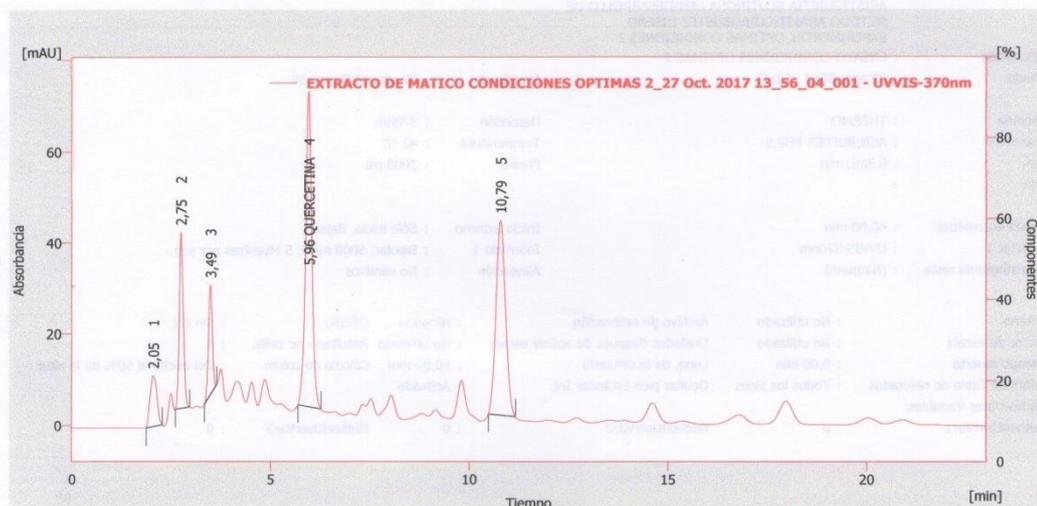
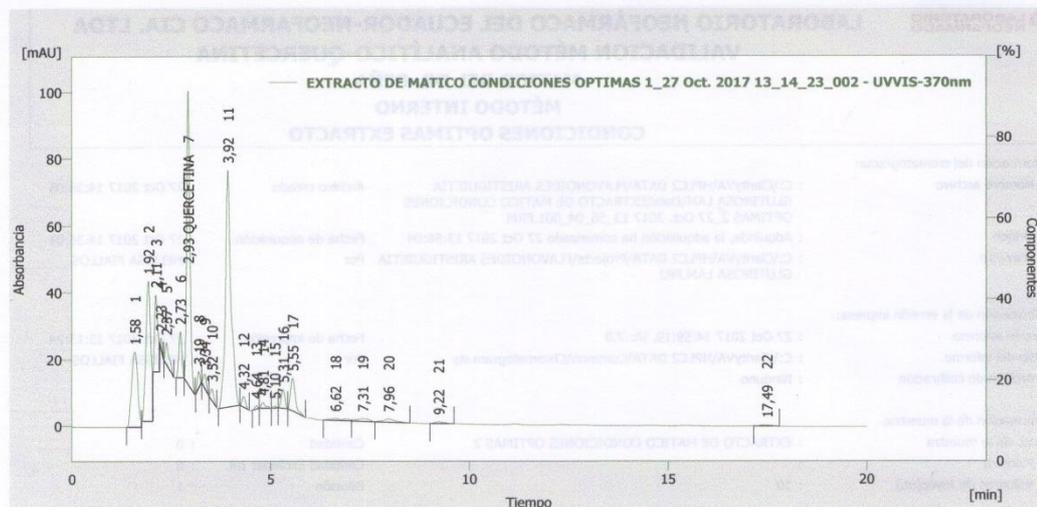
Id. de la muestra	: ESTANDAR QUERCETINA ANALISTA B DÍA 1 - PRECISIÓN INTERMADIA	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[µL]	: 3	Dilución	: 1



Anexo D. Cromatogramas correspondientes a las condiciones óptimas establecidas en el análisis del parámetro robustez. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Cromatograma C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTÁNDAR QUERCETINA DISEÑO EXPERIMENTAL 16_25 Oct. 2

LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA MATICO DEL DR. PEÑA MÉTODO INTERNO ROBUSTEZ			
Información del cromatograma:			
Nombre archivo	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTÁNDAR QUERCETINA DISEÑO EXPERIMENTAL 16_25 Oct. 2017_20_18_03_0391.PRM	Archivo creado	: 25 Oct 2017 20:30:04
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 25 Oct 2017 20:18:03	Fecha de adquisición	: 25 Oct 2017 20:30:04
Proyecto	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS
Información de la versión impresa:			
Versión impresa	: 26 Oct 2017 11:39:59, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 26 Oct 2017 12:02:05
Estilo del informe	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		
Información de la muestra:			
Id. de la muestra	: ESTÁNDAR QUERCETINA DISEÑO EXPERIMENTAL 16	Cantidad [µL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[µL]	: 3	Dilución	: 1
Método	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\VALIDACION DE MÉTODO ANALITICO\ROBUSTEZ DISEÑO EXPERIMENTAL 16	Por	: MELISSA FIALLOS
Descripción	: DISEÑO EXPERIMENTAL 15 - ROBUSTEZ		
Creado	: 30 ago. 2017 12:33	Modificado	: 26 oct. 2017 11:39



Anexo E. Cromatogramas correspondientes al análisis del parámetro de estabilidad del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Cromatograma C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION 0 HORAS

LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN a 0 Horas

Información del cromatograma:

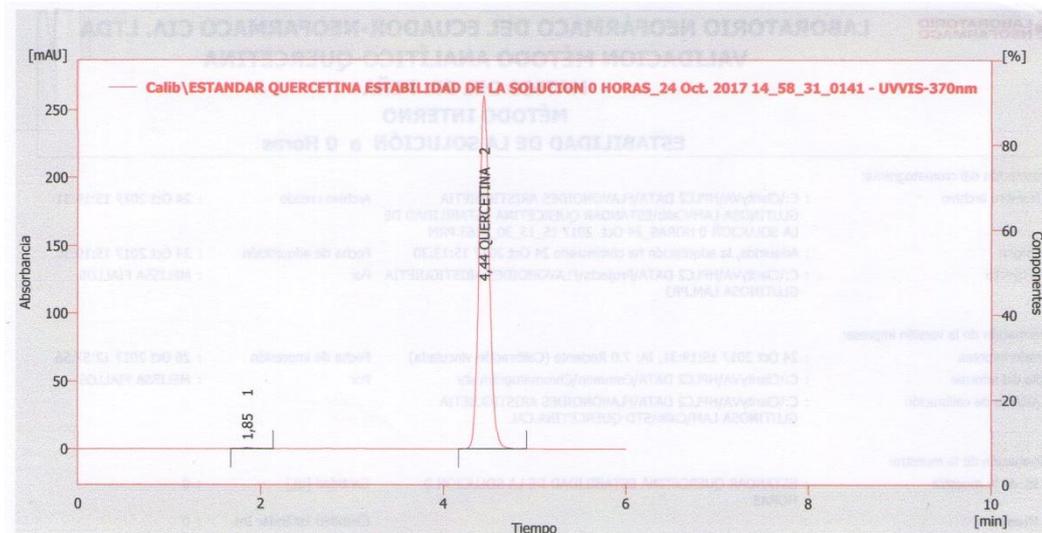
Nombre archivo	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION 0 HORAS_24 Oct. 2017 15_13_30_0163.PRM	Archivo creado	: 24 Oct 2017 15:19:31
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 24 Oct 2017 15:13:30	Fecha de adquisición	: 24 Oct 2017 15:19:30
Proyecto	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 24 Oct 2017 15:19:31, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 26 Oct 2017 12:57:56
Estilo del informe	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\Clarity\VA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

Id. de la muestra	: ESTANDAR QUERCETINA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION 0 HORAS	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[μL]	: 10	Dilución	: 1



LABORATORIO NEOFARMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN a 12 Horas

Información del cromatograma:

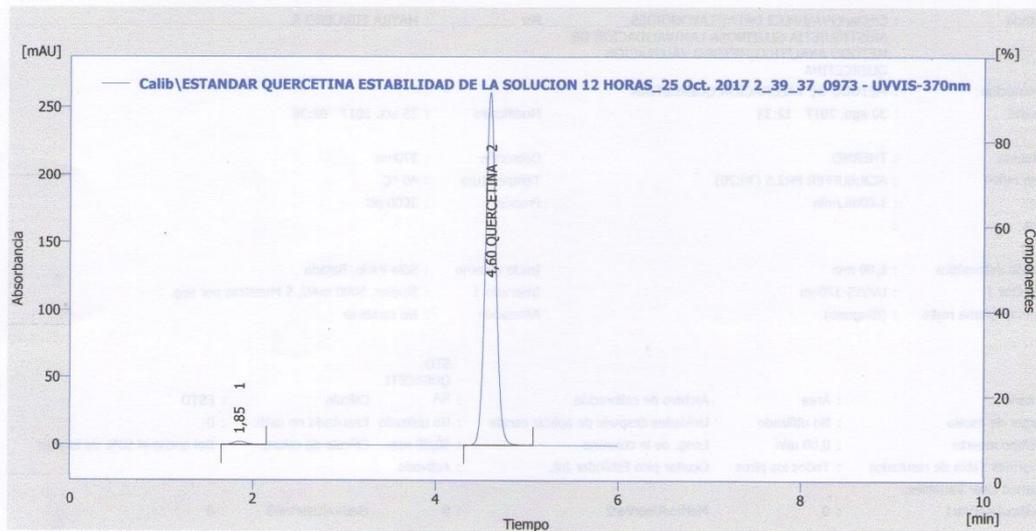
Nombre archivo	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION 12 HORAS_25 Oct. 2017 2_32_08_0962.PRM	Archivo creado	: 25 Oct 2017 2:38:09
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 25 Oct 2017 2:32:08	Fecha de adquisición	: 25 Oct 2017 2:38:09
Proyecto	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 25 Oct 2017 2:38:09, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 26 Oct 2017 13:02:53
Estilo del informe	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

Id. de la muestra	: ESTANDAR QUERCETINA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION 12 HORAS	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[μL]	: 10	Dilución	: 1





LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN a 24 Horas

Información del cromatograma:

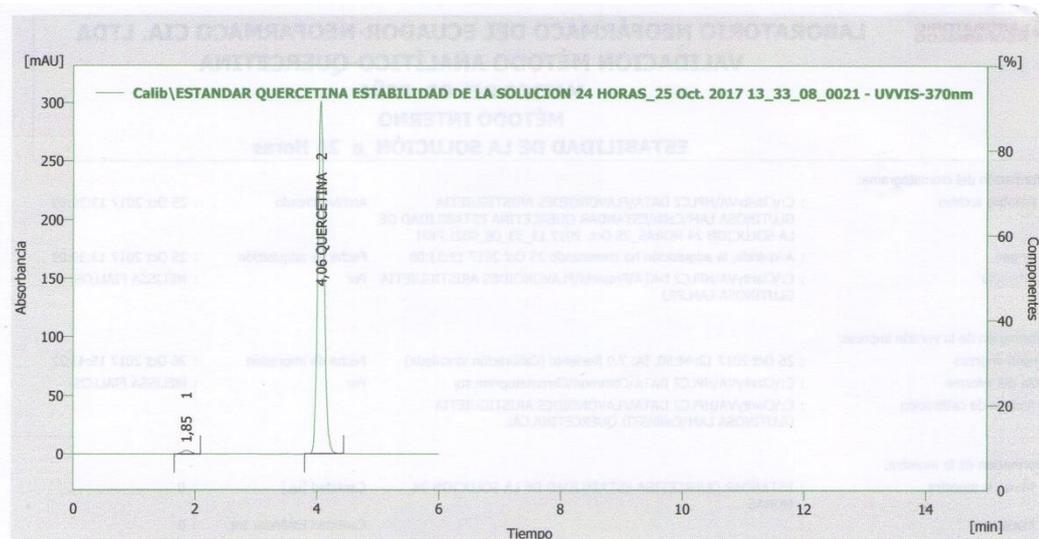
Nombre archivo	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION 24 HORAS_25 Oct. 2017 13_33_08_0021.PRM	Archivo creado	: 25 Oct 2017 13:39:09
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 25 Oct 2017 13:33:08	Fecha de adquisición	: 25 Oct 2017 13:39:09
Proyecto	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ	Por	: MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa	: 26 Oct 2017 12:44:50, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 26 Oct 2017 15:43:22
Estilo del informe	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL		

Información de la muestra:

Id. de la muestra	: ESTANDAR QUERCETINA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION 24 HORAS	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[μL]	: 10	Dilución	: 1





LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
DEGRADACIÓN FORZADA

Información del cromatograma:

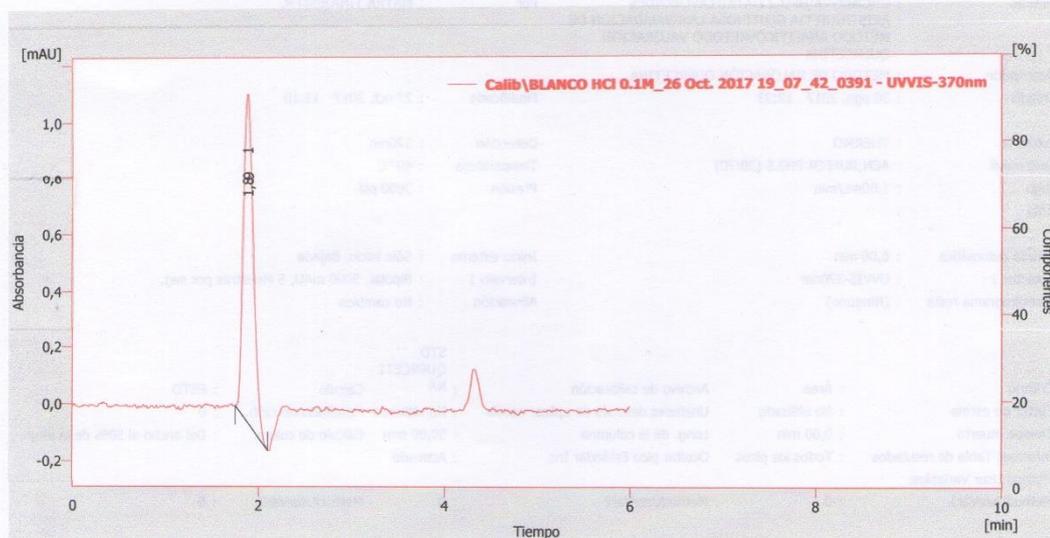
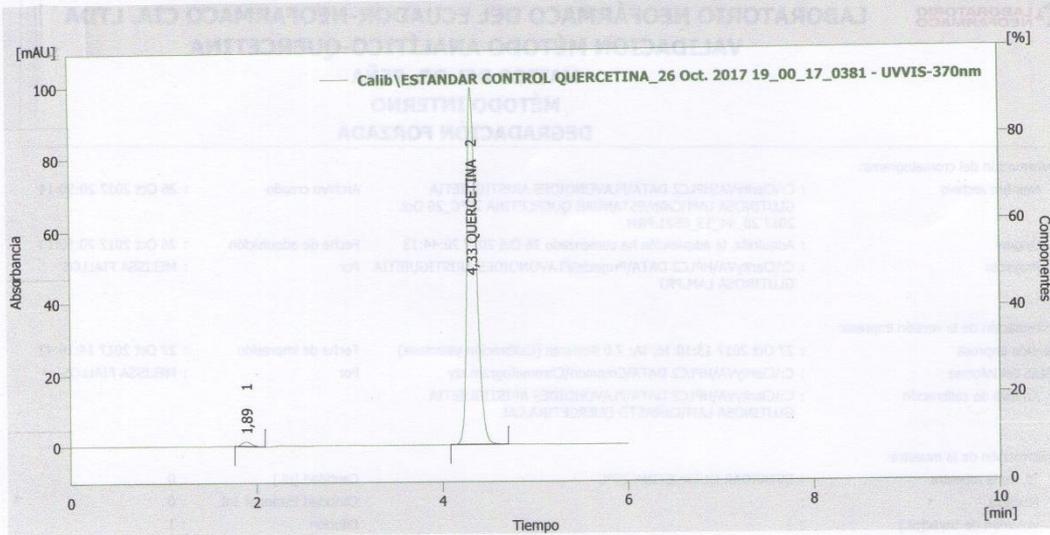
Nombre archivo	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM(Calib)\ESTANDAR QUERCETINA 25°C_26 Oct. 2017 20_44_13_0521.PR	Archivo creado	: 26 Oct 2017 20:50:14
Origen	: Adquirida, la adquisición ha comenzado 26 Oct 2017 20:44:13	Fecha de adquisición	: 26 Oct 2017 20:50:13
Proyecto	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PR	Por	: MELISSA FIALLOS

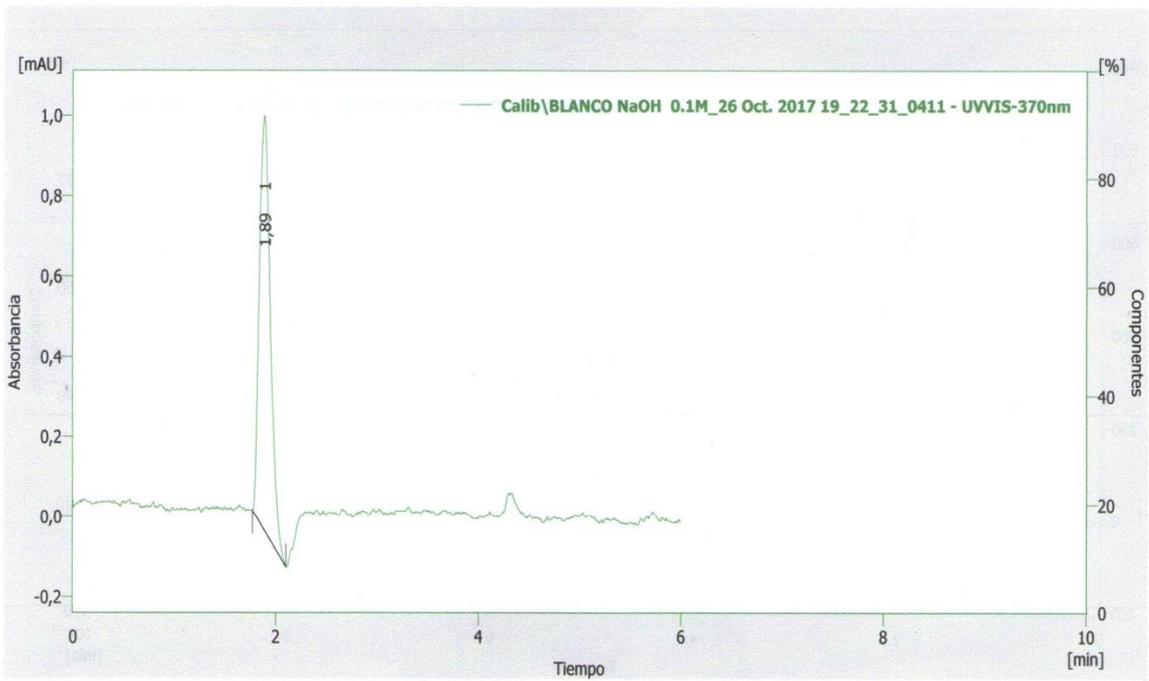
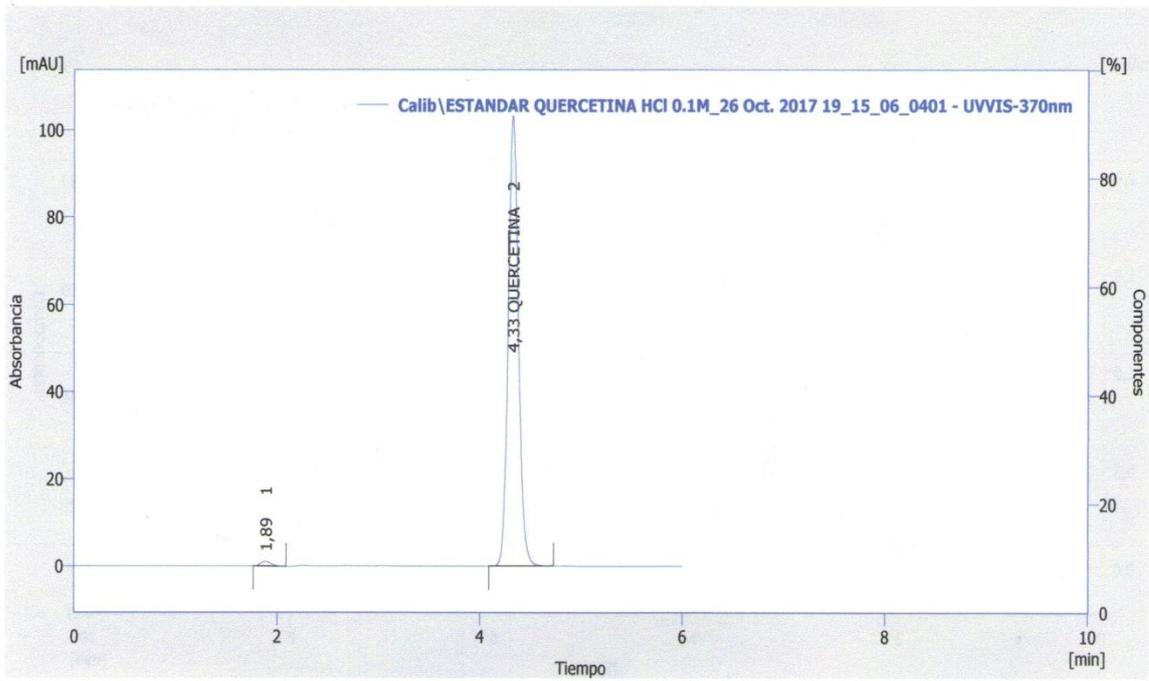
Información de la versión impresa:

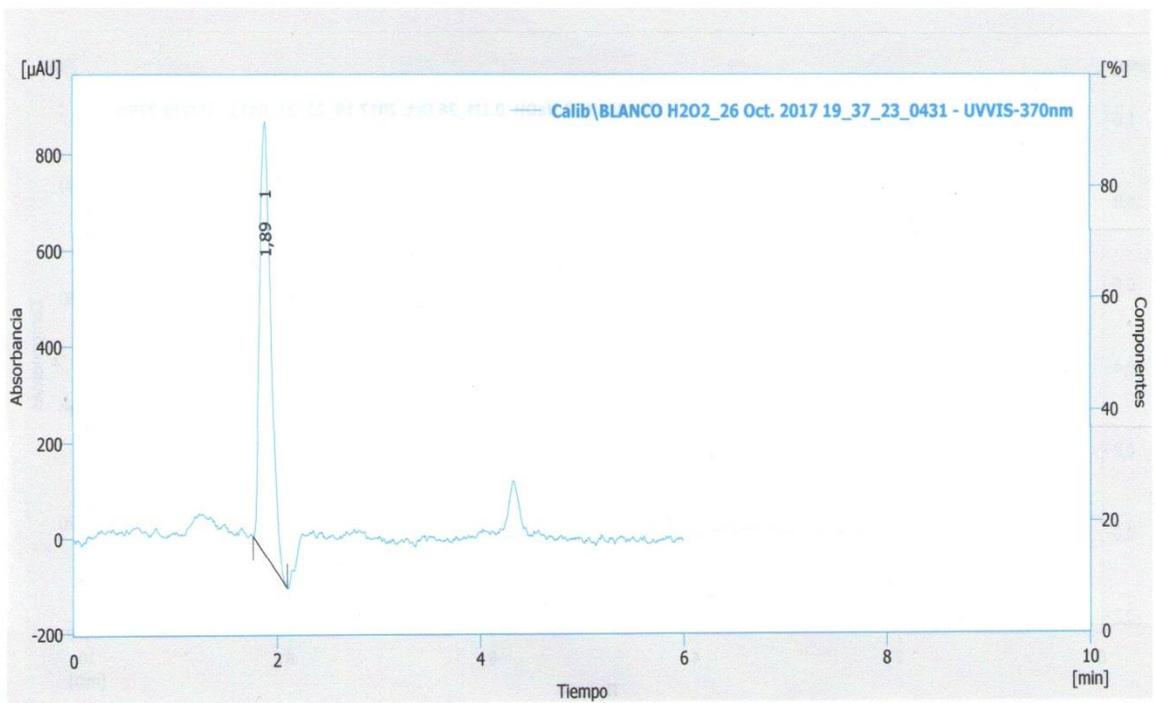
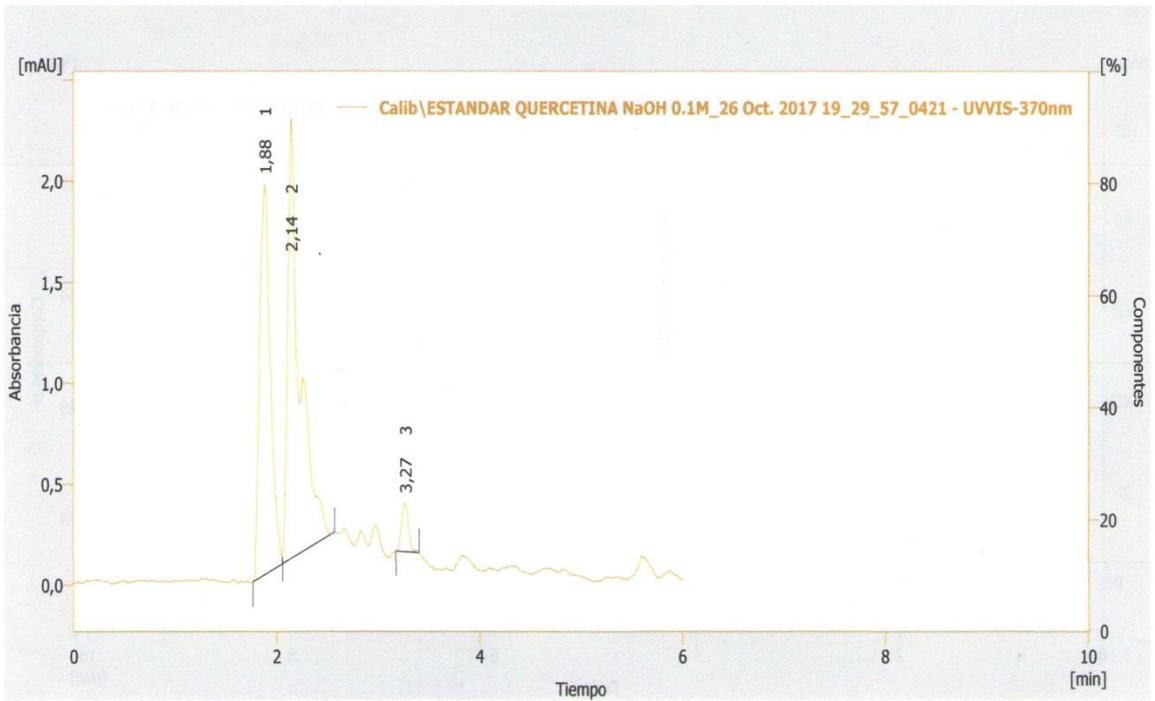
Versión impresa	: 27 Oct 2017 13:10:16, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada)	Fecha de impresión	: 27 Oct 2017 14:16:42
Estilo del informe	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty	Por	: MELISSA FIALLOS
Archivo de calibración	: C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM(Calib)\STD QUERCETINA.CAL		

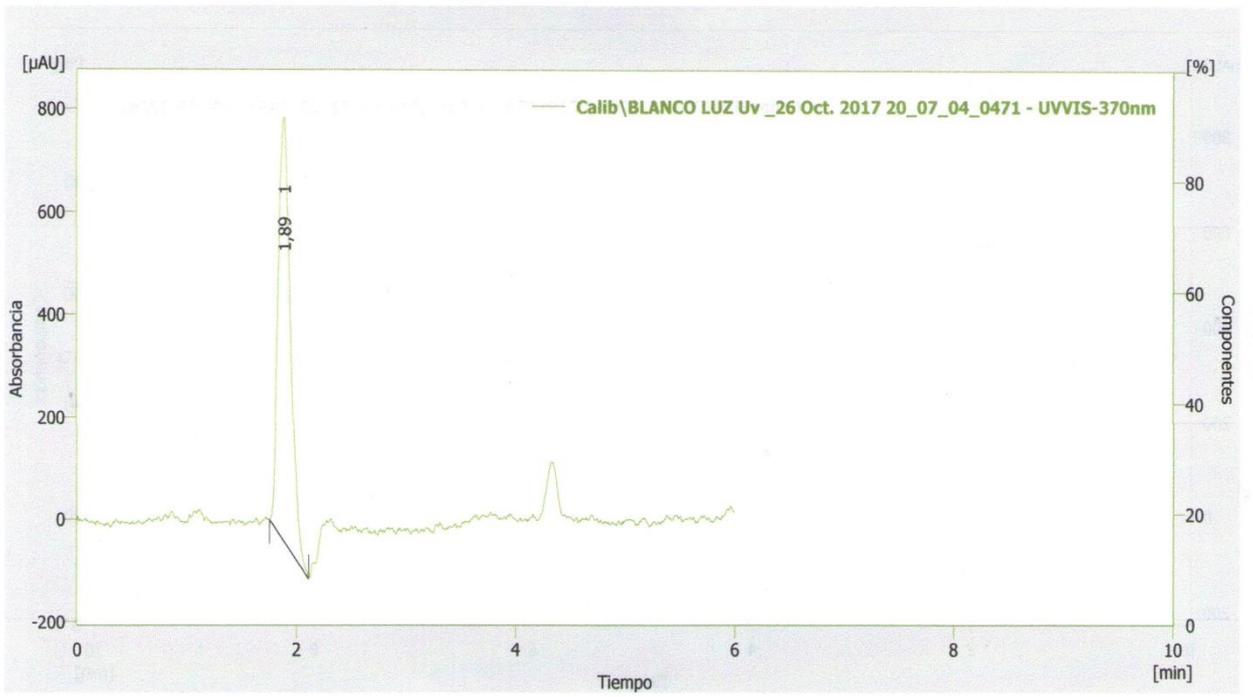
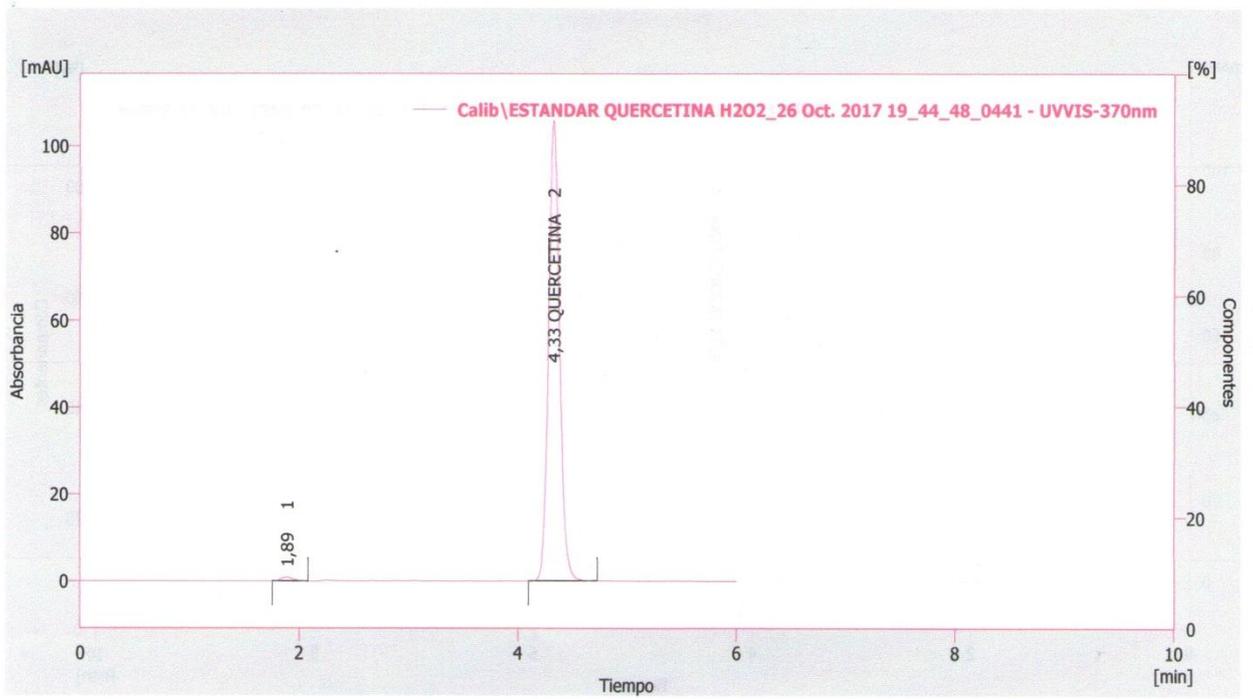
Información de la muestra:

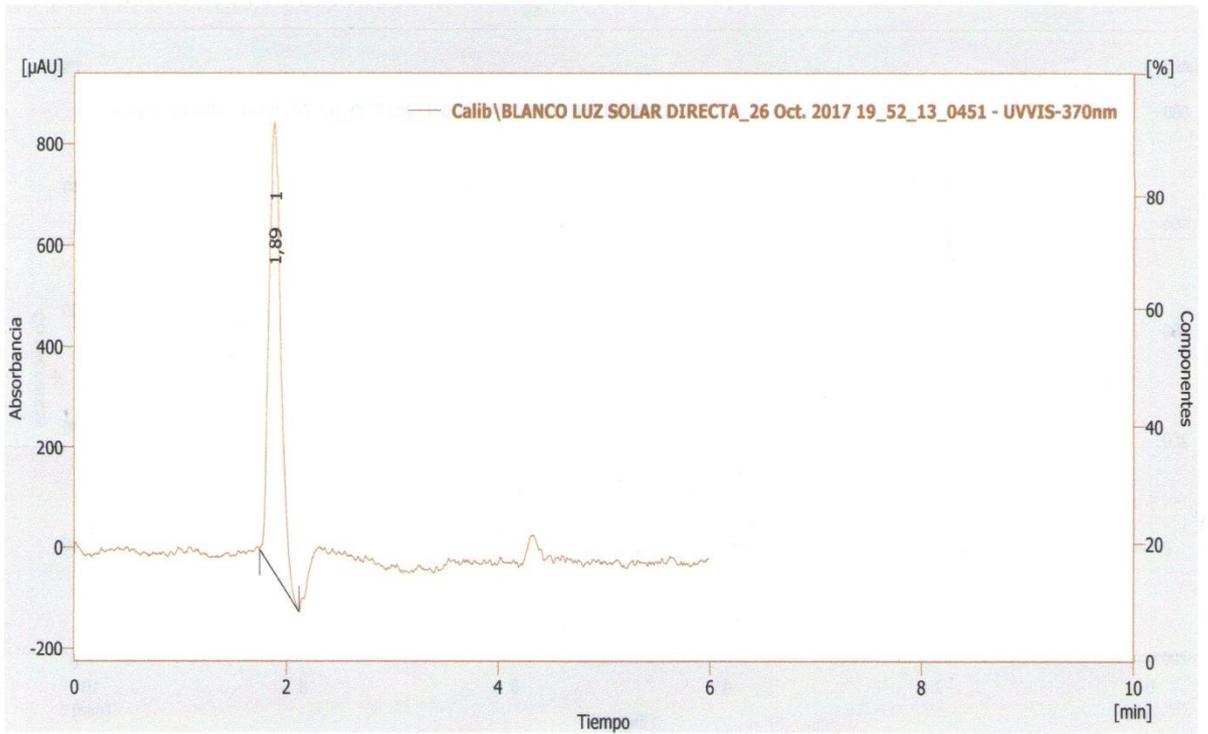
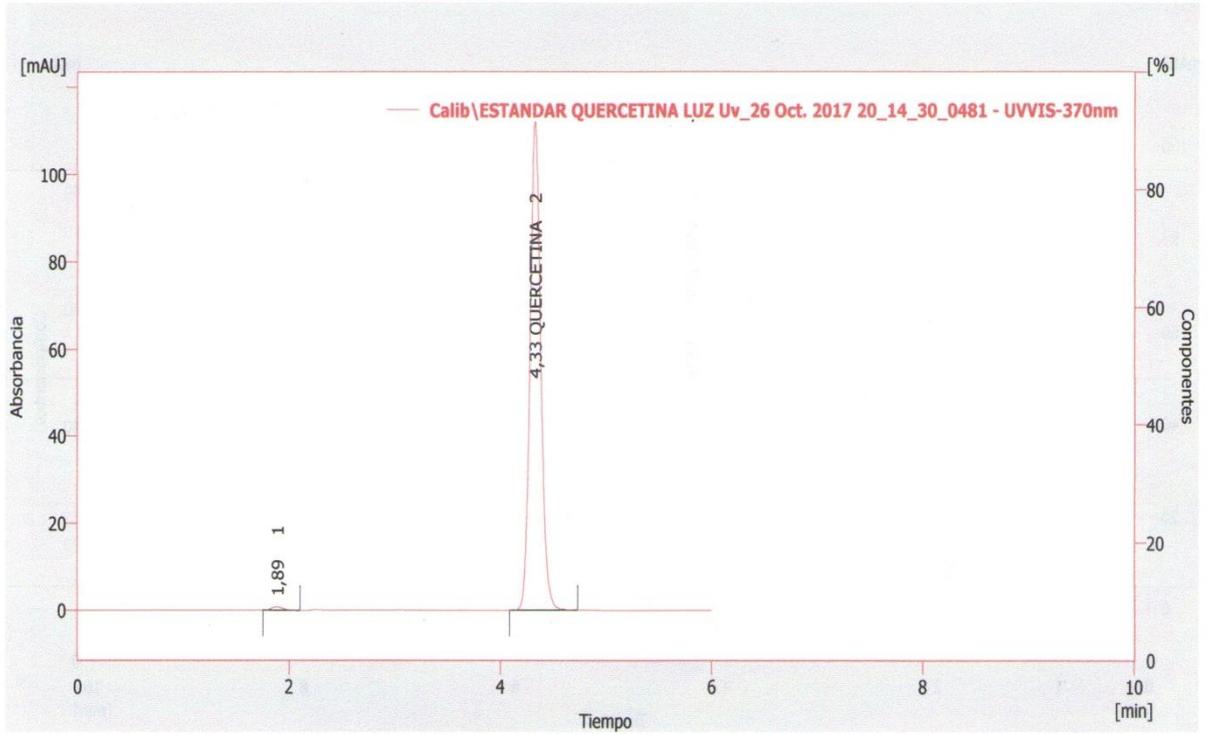
Id. de la muestra	: ESTANDAR QUERCETINA 25°C	Cantidad [uL]	: 0
Muestra	:	Cantidad Estándar Int.	: 0
Volumen de Inyec[μL]	: 3	Dilución	: 1

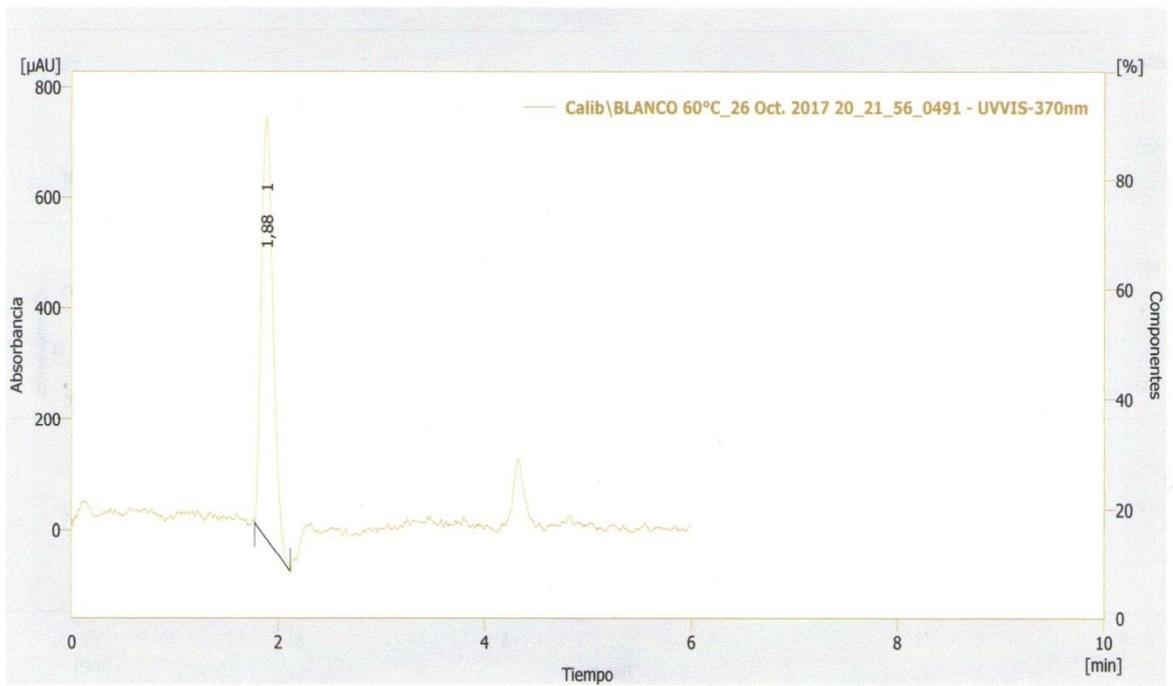
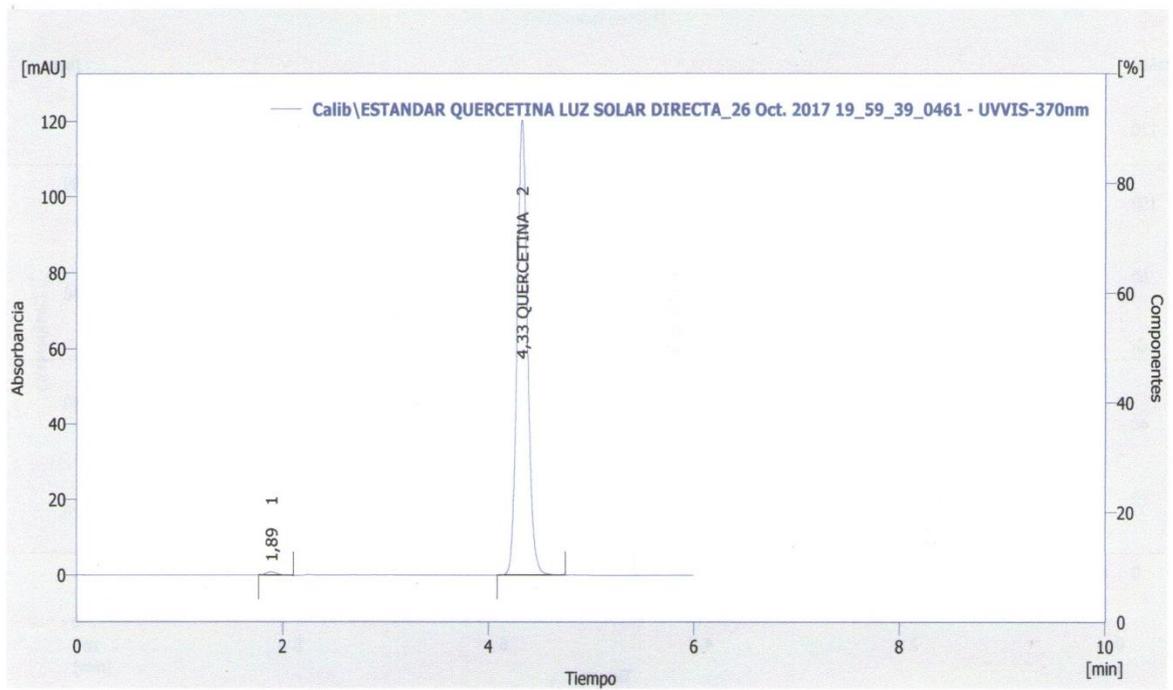


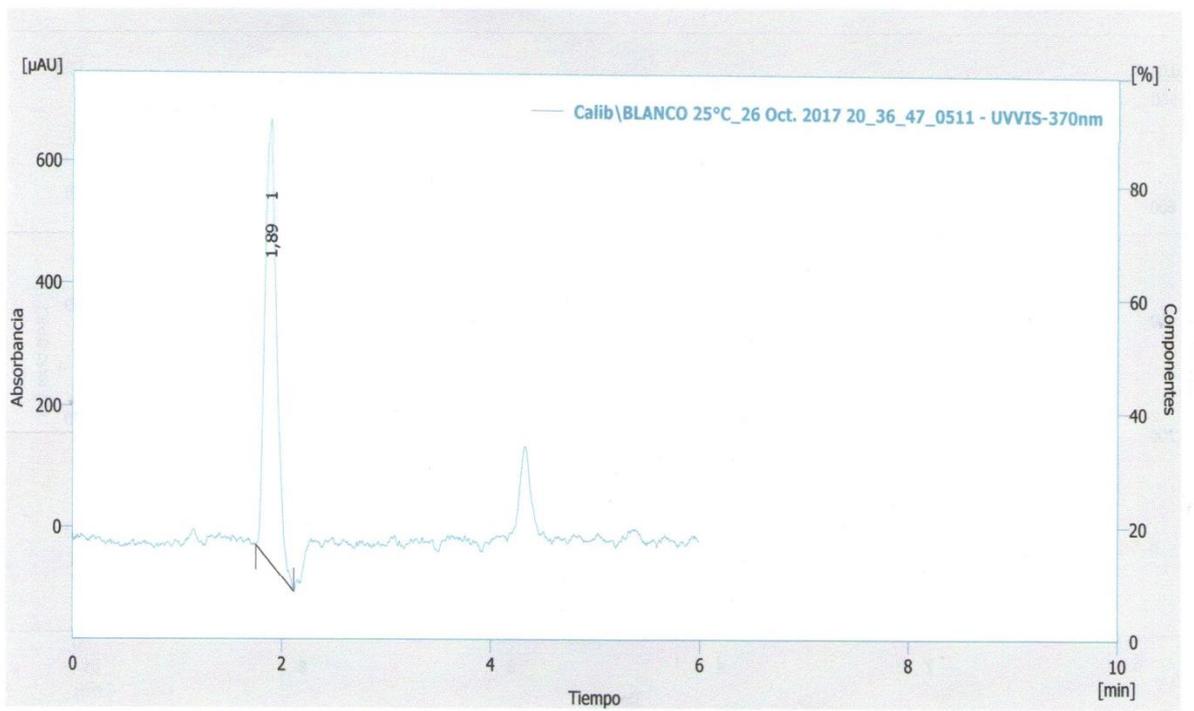
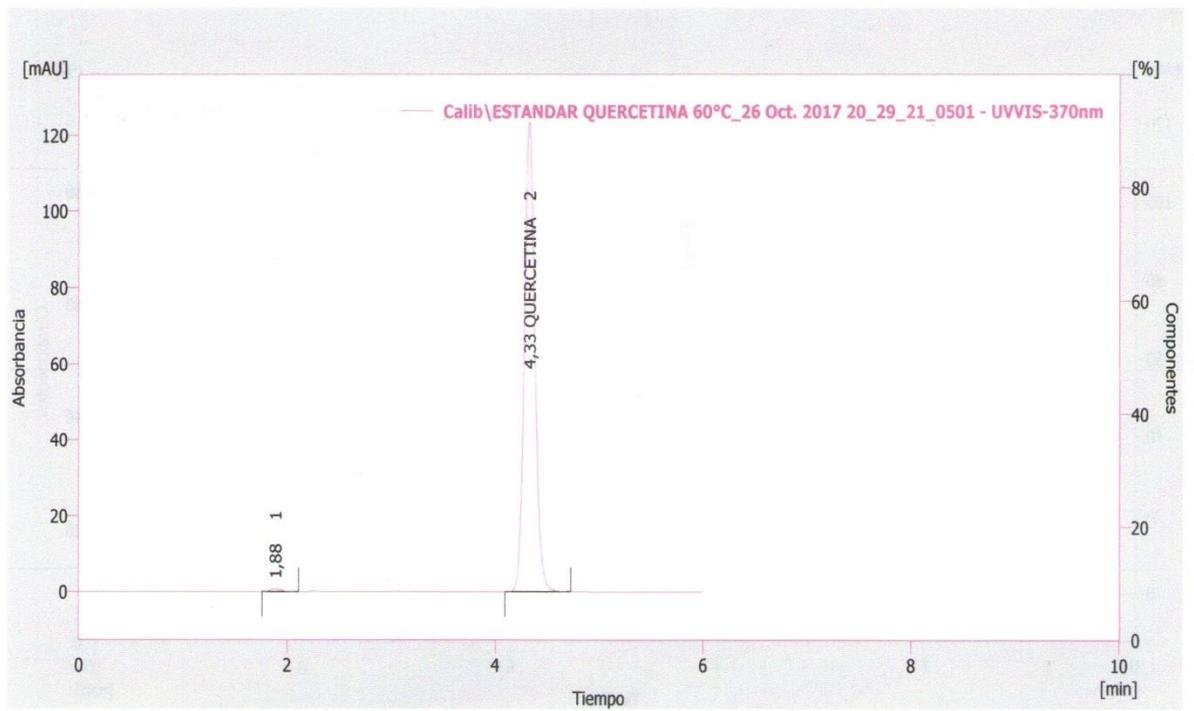


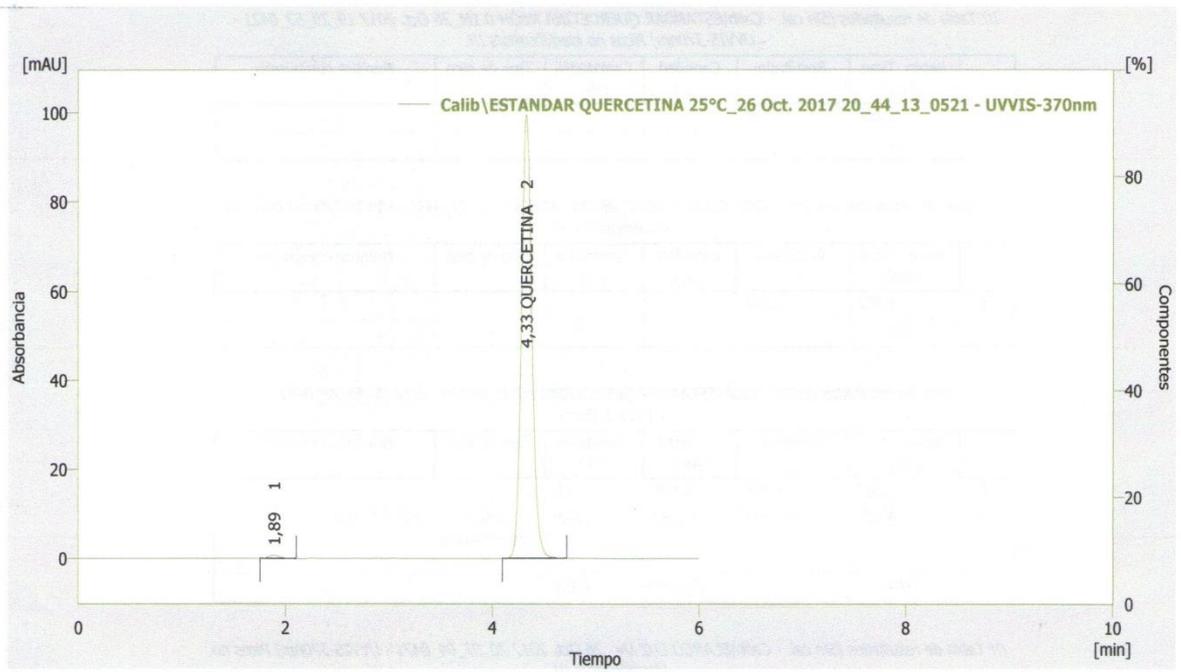












Anexo F. Reporte del test de idoneidad del sistema del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Cromatograma C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct.

LABORATORIO NEOFÁRMACO DEL ECUADOR-NEOFARMACO CIA. LTDA
VALIDACION MÉTODO ANALÍTICO-QUERCETINA
MATICO DEL DR. PEÑA
MÉTODO INTERNO
SST

Información del cromatograma:

Nombre archivo : C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct. 2017 18_14_48_0291.PRM Archivo creado : 24 Oct 2017 18:20:49

Origen : Adquirida, la adquisición ha comenzado 24 Oct 2017 18:14:48 Fecha de adquisición : 24 Oct 2017 18:20:49

Proyecto : C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Projects\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM.PRJ Por : MELISSA FIALLOS

Información de la versión impresa:

Versión impresa : 26 Oct 2017 12:15:07, IA: 7.0 Reciente (Calibración vinculada) Fecha de impresión : 26 Oct 2017 12:26:15

Estilo del informe : C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\Common\Chromatogram.sty Por : MELISSA FIALLOS

Archivo de calibración : C:\ClarityVA\HPLC2 DATA\FLAVONOIDES ARISTIGUIETIA GLUTINOSA LAM\Calib\STD QUERCETINA.CAL

Información de la muestra:

Id. de la muestra : ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA Cantidad [uL] : 0

Muestra : Cantidad Estándar Int. : 0

Volumen de Inyec[uL] : 3 Dilución : 1

MétodoSST : Sin nombre
 Descripción : VALIDACIÓN DE MÉTODO - MATICO DEL DR. PEÑA
 Creado : 26 Oct 2017 12:16:40 Por : MELISSA FIALLOS

Tablas de componentes SST

✓ - Resultado SST global

	Utiliza do	Satis factorio	Componente Nombre	Retention Time
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	QUERCETINA	4,573

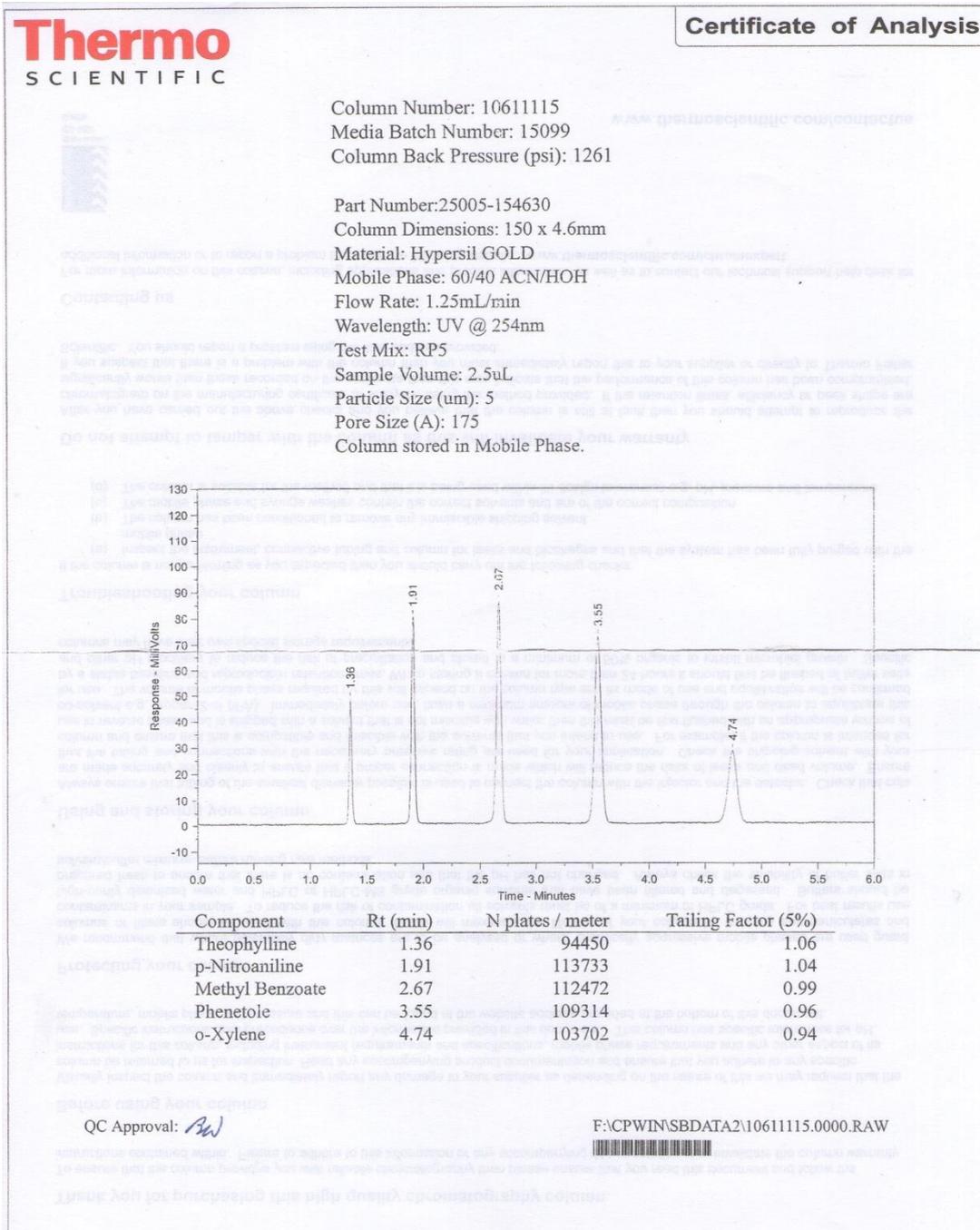
✓ - Resultado SST para el componente "QUERCETINA", Calculado por : "USP"
 Calculado a partir de la media

X	SST	Cromatograma	Retention Time [min]	Area [ND.s]	Asimetría [-]	Capacidad [-]	Eficiencia [pl.teor.]
		Límite inferior				1,000	2000,000
		Límite superior			2,000		
		Límite %RSD	2,00	2,00	2,00	2,00	
		Nombre	4,497	607,017	1,218	1,405	9123,242
		RSD [%]	0,07	0,30	1,46	0,11	1,94
		Resultado del parámetro	✓	✓	✓	✓	✓
	<input checked="" type="checkbox"/>	Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct. 2017 18_14_48_0291	4,493	606,426	1,207	1,403	8948,496
	<input checked="" type="checkbox"/>	Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct. 2017 18_51_52_0346	4,500	604,756	1,241	1,406	9298,469
	<input checked="" type="checkbox"/>	Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct. 2017 18_44_27_0335	4,500	607,770	1,207	1,406	8975,069
	<input checked="" type="checkbox"/>	Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct. 2017 18_37_02_0324	4,497	605,410	1,241	1,405	9284,699
	<input checked="" type="checkbox"/>	Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct. 2017 18_29_38_0313	4,497	609,692	1,207	1,405	8961,778
	<input checked="" type="checkbox"/>	Calib\ESTANDAR QUERCETINA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA_24 Oct. 2017 18_22_13_0302	4,493	608,050	1,207	1,403	9270,939

26-Oct-2017
 Fecha


 Firma

Anexo G. Certificado de análisis de la columna cromatográfica utilizada en el desarrollo y validación del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.



Column Number: 10611115
 Media Batch Number: 15099
 Column Back Pressure (psi): 1261

Part Number: 25005-154630
 Column Dimensions: 150 x 4.6mm
 Material: Hypersil GOLD
 Mobile Phase: 60/40 ACN/HOH
 Flow Rate: 1.25mL/min
 Wavelength: UV @ 254nm
 Test Mix: RP5
 Sample Volume: 2.5uL
 Particle Size (um): 5
 Pore Size (A): 175
 Column stored in Mobile Phase.

Component	Rt (min)	N plates / meter	Tailing Factor (5%)
Theophylline	1.36	94450	1.06
p-Nitroaniline	1.91	113733	1.04
Methyl Benzoate	2.67	112472	0.99
Phenetole	3.55	109314	0.96
o-Xylene	4.74	103702	0.94

QC Approval: *BW*

F:\CPWIN\SBDATA2\10611115.0000.RAW



Anexo H. Certificado de validación del programa estadístico empleado en el proceso de validación del método analítico. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.

Data Validation Tools | Data Validation Software | Statgraphics <http://www.statgraphics.com/validation>

statgraphics 18 PRODUCTS LEARN TRAINING 

STORE

Validation

TECHNICAL SUPPORT

- Customer Support Overview
- FAQ's
- Maintenance Updates
- Download Center
- Validation
- Section 508 Compliance

All STATGRAPHICS analyses are validated by comparing the numerical results to one or more sources, including textbooks, journal articles, government benchmarks, hand calculations, and output from other well-established statistical programs. Recognizing that many companies that deal with regulatory agencies such as the FDA are required to use data validation software, we will provide registered users with information and data validation tools to help facilitate that process.

Calculations

The PDF files provided with each statistical procedure outline the important calculations performed in that procedure. They also work through an example involving a typical set of data. Sample files containing the data used in each procedure and an associated Statfolio are installed in the "data" folder of the directory containing the Statgraphics executable.

Software Quality Control and Data Validation Tools

Each release of STATGRAPHICS is subjected to rigorous tests before release to the public, both to ensure that it functions properly and to validate the numerical results. A document describing in detail the procedures employed to

de 2 15/17/2017 0:11

**Anexo I. Evidencia fotográfica del desarrollo y validación del método analítico para la determinación del marcador fitoquímico en el producto MATICO DEL DR. PEÑA®
Tabletas. Laboratorio NEOFARMACO. Ambato, 2018.**



Fotografía 1. Equipo UPLC y HPLC con detector Uv.



Fotografía 2. MATICO Del Dr. Peña® Extracto y Tabletas.



Fotografía 3. Preparación de las muestras.



Fotografía 4. Cromatografía en capa fina (Estándar quercetina vs. muestra)



Fotografía 5. Activación de la columna cromatográfica



Fotografía 6. Estándar quercetina (USP).



Fotografía 7. Preparación fase móvil – HPLC.



Fotografía 8. Acondicionamiento y lectura de la muestras.