FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS

"VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CURCUMINOIDES EN PALILLO COMERCIAL POR CROMATOGRAFÍA LIQUÍDA DE ALTA PERFORMANCE"

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

KENYI IRINEO GUERRA HUAMAN

YELTHSIN RODRIGUEZ RIOS

ASESORES

QF. CARLOS ENRIQUE CALLOAPAZA VALLADARES, Mgr.

Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO

IQUITOS, PERÚ

2020

"Año de la Universalización de la Salud"

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N°039-PCGT-FFyB-UNAP-2020/OFICIO N°001-2019-DIVN-UNAP

En la ciudad de Iquitos, Distrito de Iquitos, Departamento de Loreto, por vía Zoom de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, a los 28 días del mes de agosto de 2020, a horas 19:30, se dio inicio a la sustentación pública de Tesis titulado **"VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CURCUMINOIDES EN PALILLO COMERCIAL POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE"**, aprobado con **Resolución Decanal N°165-2020-FFyB-UNAP**, presentado por las Bachilleres: **KENYI IRINEO GUERRA HUAMÁN Y YELTHSIN RODRÍGUEZ RÍOS**, para optar el Título Profesional de Químico(a) Farmacéutico(a) que otorga la Universidad de acuerdo a Ley y Estatuto.

El jurado calificador y dictaminador designado mediante **Resolución Decanal N°231-FFyB-UNAP-2018** está integrada por:

- **Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUIZ, Mgr.** — **Presidente**
- **Q.F. IVONNE NAVARRO DEL AGUILA, Mgr.** — **Miembro**
- **ING. CLETO JARA HERRERA, MSc.** — **Miembro**

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: ....adecuadamente....

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la tesis han sido ....aprobada....con la calificación ....Buena....

Estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Químico(a) Farmacéutico(a).

Siendo las ....20:50.... se dio por terminado el acto ....académico....

Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUIZ, Mgr.
Presidente

Q.F. IVONNE NAVARRO DEL AGUILA, Mgr.
Miembro

ING. CLETO JARA HERRERA, MSc.
Miembro

Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO
Asesor

Q.F. CARLOS ENRIQUE CALLOAPAZA VALLADARES, Mgr.
Asesor

UNIVERSIDAD LICENCIADA
RESOLUCIÓN N°012-2019-SUNEDU/CD
Lima, 1 de febrero de 2019

MIEMBROS DEL JURADO

Tesis aprobada en la Sustentación Virtual – Servidor ZOOM, el 28 de agosto del 2020 por los jurados nombrados por la Dirección de la Facultad de Farmacia y Bioquímica para optar el Titulo de:

Químico Farmacéutico

Q.F Brenda Soraya Urday Ruiz, Mgr.
PRESIDENTE DEL JURADO

Q.F. Ivonne Navarro del Aguila, Mgr.
MIEMBRO DEL JURADO

Ing. Cleto Jara Herrera, MSc.
MIEMBRO DEL JURADO

AUTORIZACIÓN DE LOS ASESORES

El Químico Farmacéutico, Carlos Enrique Calloapaza Valladares Mgr., docente auxiliar adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioquímica, y el Químico Farmacéutico, Wilfredo Oswaldo Gutiérrez Alvarado, docente auxiliar adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

INFORMAN:

Que los bachilleres **KENYI IRINEO GUERRA HUAMAN** y **YELTHSIN RODRIGUEZ RIOS** han realizado bajo nuestra dirección, el trabajo contenido en la tesis intitulada: **VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CURCUMINOIDES EN PALILLO COMERCIAL POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE**, y considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado, ante el jurado calificador, a tal efecto damos pase para su sustentación y posterior obtención del Título Profesional.

AUTORIZAMOS: A los citados Bachilleres a presentar el trabajo Final de carrera, para proceder a su sustentación cumpliendo así con la normativa vigente que regula el Reglamento de Grados y Títulos en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

Q.F. Carlos Enrique.
Calloapaza Valladares Mgr.

Q.F. Wilfredo Oswaldo
Gutiérrez Alvarado

DEDICATORIA

A Dios quien me ha brindado la sabiduría necesaria para lograr este objetivo**.** A mi familia que siempre estuvo apoyándome con los recursos necesarios para culminar esta prestigiosa carrera.

Kenyi Irineo

A mi padre Wilder Rodriguez, a mis hermanas quienes supieron guiarme en el transcurso de mi vida, en especial a mi madre Maria del Pilar Rios quien hizo de mí una persona tanto en ético, moral y profesional.

Yelthsin

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana por la excelente educación que nos brindó durante los años de estudio.

Al personal del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa por brindarme las facilidades para la realización de esta investigación.

A nuestros asesores, Director de Escuela Profesional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Q.F. Wilfredo Oswaldo Gutiérrez Alvarado y al Q.F Carlos Enrique Calloapaza Valladares, Mgr., sin cuyo asesoramiento no hubiera sido posible la realización de esta investigación; por sus invalorables enseñanzas a lo largo de nuestra carrera profesional.

A la docente Q.F. Frida Enriqueta Sosa Amay por brindarme su amistad, su invaluable orientación, consejos, sugerencias y apoyo en la culminación del presente trabajo.

Kenyi Irineo y Yelthsin

ÍNDICE GENERAL

Pág.

PORTADA……....i
ACTA DE SUSTENTACIÓN……..ii
JURADOS……...iii
ASESORES……iv
DEDICATORIA……...v
AGRADECIMIENTO……vi
ÍNDICE GENERAL……...vii
ÍNDICE DE TABLAS……...viii
ÍNDICE DE FIGURAS……x
RESUMEN……..xi
ABSTRACT……...xii

INTRODUCCIÓN……..1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO…….....3
1.1 Antecedentes……3
1.2 Bases teóricas……...5
1.3 Definición de termino básicos……....32
CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES……....34
2.1 Formulación de la hipótesis……....34
2.2 Variables y su operacionalización……..34
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA……35
3.1 Tipo y diseño……..35
3.2 Diseño muestral……..35
3.3Procedimientos de recolección de datos……..35
3.4 Aspectos éticos……...38
CAPÍTULO IV: RESULTADOS……39
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN……...53
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES……55
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES……56
CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN……57
ANEXOS……60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Composición nutricional de 100 g de cúrcuma……..22
Tabla 02. Clasificación de tipos de cromatografías por su disposición, su fase móvil y estacionaria……16
Tabla 03. Criterios de aceptación para la precisión……28
Tabla 04. Criterios para evaluar el coeficiente de correlación……28
Tabla 05. Concentraciones teóricas y prácticas del estándar de bisdetoxicurcumina determinadas por HPLC……..39
Tabla 06. Determinación de los parámetros de linealidad del sistema para la validación del método de determinación de la bisdetoxicurcumina…….....40
Tabla 07. Análisis de varianza con la prueba F para la bisdetoxicurcumina……40
Tabla 08. Análisis de varianza con la prueba de t de la Bisdetoxicurcumina……...40
Tabla 09. Presenta el intervalo de confianza del error estándar de la Bisdetoxicurcumina……41
Tabla 10. Concentraciones teóricas y prácticas del estándar de determinadas por HPLC……..41
Tabla 11. Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión de la detoxicurcumina……42
Tabla 12. Análisis de varianza con la prueba F para la detoxicurcumina……42
Tabla 13. Análisis de varianza con la prueba de t de la detoxicurcumina……42
Tabla 14. Presenta el intervalo de confianza del error estándar de la detoxicurcumina……43
Tabla 15. Concentraciones teóricas y prácticas del estándar curcumina determinadas por HPLC……43
Tabla 16. Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión de la curcumina……... 44
Tabla 17. Análisis de varianza con la prueba F de la curcumina…….....44
Tabla 18. Análisis de varianza con la prueba de t de la curcumina……..44
Tabla 19. Presenta el intervalo de confianza del error estándar de la curcumina…....45
Tabla 20. Evaluación de la precisión de la concentración práctica frente a la concentración teórica media de Bisdetoxicurcumina disuelta en metanol (15,6912 mg/mL)……45

Tabla 21. Evaluación de la precisión de la concentración práctica frente a la concentración teórica media de detoxicurcumina disuelta en metanol (20,0872mg/mL)…….46

Tabla 22. Evaluación de la precisión de la concentración teórica media de curcumina disuelta en metanol (104,2216 mg/mL)……..47

Tabla 23. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas para Bisdetoxicurcumina……48

Tabla 24. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas para Detoxicurcumina……48

Tabla 25. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas para Curcumina……..49

Tabla 26. Se presentan los límites de cuantificación y detección para bisdetoxicurcumina……50

Tabla 27. Se presentan los límites de cuantificación y detección para detoxicurcumina…….51

Tabla 28. Se presentan los límites de cuantificación y detección para curcumina…...52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Sección del árbol filogenético de las Angiospermas según el Sistema de Clasificación APG III del 2009……...5

Figura 02. Imagen de la planta en estudio…….....6

Figura 03. Síntesis de curcumina por la ruta de biosíntesis de estilbenoides, derivado de la ruta del Shikimato /Acetato-malonato……8

Figura 04. Derivación de la síntesis de los curcuminoides más importantes de la Cúrcuma longa……... 9

Figura 05. Estructura química de compuestos presentes en la Cúrcuma longa…….....9

Figura 06. Imágenes sobre la variedad de platos en los que se utiliza la cúrcuma....11

Figura 07. Degradación artificial de la base nitrogenada A-351 por el esquema propuesto……..19

Figura 08. Derivada segunda de un cromatograma mostrando bandas superpuestas..21

Figura 09. Efectos de matriz, aditivos y multiplicativos, en comparación con el estándar puro……23

Figura 10. Representación gráfica de la linealidad de la bisdetoxicurcumina…….39

Figura 11. Representación gráfica de la linealidad de la detoxicurcumina……41

Figura 12. Representación gráfica de la linealidad de la curcumina……...43

Figura 13. Representación gráfica de la concentración vs desviación estándar de Bisdetoxicurcumina……. 50

Figura 14. Representación gráfica de la concentración vs desviación estándar de Detoxicurcumina……..51

Figura 15. Representación gráfica de la concentración vs desviación estándar de Curcumina……52

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CURCUMINOIDES EN PALLILO COMERCIAL POR CROMATOGRAFÍA LIQUÍDA DE ALTA PERFORMANCE”

RESUMEN

El laboratorio de análisis debe asegurar que los métodos normalizados pueden desarrollarse de manera óptima, antes de entrar en operaciones los ensayos o calibraciones. El objetivo de este trabajo fue validar el método analítico para cuantificar curcuminoides por Cromatografía Líquida de Alta Performance - HPLC. El estudio analítico y diseño experimental permitió procesar inicialmente cuatro muestras (A, B, C, D) cada una de 25,0 mg. Luego, para efectos de evaluación de los parámetros de desempeño del procedimiento analítico se prosiguió solo con la muestra “D” con una concentración de 0,14 mg/mL (140 ppm).

Los resultados del HPLC demostrados estadísticamente evaluaron la linealidad, exactitud y precisión del proceso dando conformidad a lo planteado y para mayor sustento se determinó el límite de detección que dio como resultado para bisdetoxicurcumina 1,032, detoxicurcumina 1,034 y curcumina 1,017 μg/mL lo que nos indica que el analito puede ser detectado y el límite de cuantificación en el mismo orden de curcuminoides dio como resultado 1,109; 1,114 y 1,057 μg/mL; lo que nos indica que a esta concentración el analito puede ser valorado, con un grado de confianza previamente establecido de exactitud, en su mayoría el porcentaje de recuperación dio entre 98 - 102 % y el Test de recuperación media para $p = 0,05$; y $n - 1$ grados de libertad dio un t experimental que indica que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico; por lo que se puede afirmar que el método analítico propuesto es exacto. Para la precisión se demostró que hay repetibilidad y precisión intermedia en su mayoría de las mediciones excepto para la bisdetoxicurcumina que el RSD $\leq$ 2,0 bajo las condiciones experimentales establecidas. Se concluyó que los resultados de estos parámetros de desempeño demuestran la validación del procedimiento analítico planteado por su linealidad, exactitud y precisión.

Palabras claves: Validación, Cromatografía Liquida de Alta Performance (H.P.L.C), Curcuminoides.

"VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHOD TO QUANTIFY CURCUMINOIDS IN COMMERCIAL PALLILO BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY"

ABSTRACT

The analytical laboratory must ensure that standardized methods can be developed optimally, before testing or calibrations are put into operation. The objective of this work was to validate the analytical method to quantify curcuminoids by High Performance Liquid Chromatography - HPLC. The analytical study and experimental design allowed to initially process four samples (A, B, C, D) each of 25,0 g. Then, for the purposes of evaluating the performance parameters of the analytical procedure, only the "D" sample was continued with a concentration of 0,14 mg / mL (140 ppm).

The statistically demonstrated HPLC results evaluated the linearity, accuracy and precision of the process, conforming to what was proposed and for greater support, the detection limit was determined that resulted in 1,032, bisdetoxycurcumin, 1,034 detoxycurcumin and 1,017 µg/mL curcumin, which indicates that the analyte can be detected and the limit of quantification in the same order of curcuminoids resulted in 1,109; 1,114 and 1,057 µg/mL; which indicates that at this concentration the analyte can be assessed, with a previously established degree of confidence of accuracy, mostly the recovery percentage gave between 98 – 102 % and the average recovery test for p = 0,05; and n - 1 degrees of freedom gave an experimental t that indicates that there is no significant difference between the percentage of recovery found and the theoretical one; so it can be stated that the proposed analytical method is accurate. For precision, it was shown that there is repeatability and intermediate precision in most of the measurements, except for bisdetoxycurcumin that the RSD ≤ 2,0 under the established experimental conditions. It was concluded that the results of these performance parameters demonstrate the validation of the analytical procedure proposed for its linearity, accuracy and precision.

Keywords: Validation, High Performance Liquid Chromatography (H.P.L.C), Curcuminoid

INTRODUCCIÓN

La *Curcuma longa* L. es una planta representativa de la medicina tradicional china y ampliamente utilizado como carminativo, laxante, antihelmíntico y una cura para la dolencia hepática. Además, se usa como especie culinaria y como colorante aprobado en los alimentos.

Los principales componentes activos incluyen curcuminoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides. La curcumina, la detoxicurcumina y la bisdetoxicurcumina pertenecen a los curcuminoides ya que son compuestos farmacológicamente significativos. Se ha demostrado que estos tres curcuminoides muestran fuertes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas y anticancerígenas. Entre ellos, se ha encontrado que la curcumina ejerce los mejores efectos inhibitorios para varios cánceres al evitar la activación y proliferación de carcinógenos e inducción de la apoptosis de las células tumorales [(1)].

Recientemente, se descubrió que la curcumina tiene propiedades beneficiosas contra la diabetes y enfermedades metabólicas crónicas y atenúa el dolor neuropático diabético. También tiene efectos nefroprotectores sobre la nefropatía diabética. Además, la curcumina puede interferir con la replicación del VIH y como un prometedor agente anti-VIH [(1)].

Los principales métodos para la determinación cuantitativa de la curcumina incluyen espectrofotometría UV, HPLC y electroforesis capilar (CE). El HPLC es conocido por su alta eficiencia y rápida separación. HPLC-UV es el más ampliamente método utilizado sin considerar su sensibilidad limitada y baja selectividad. HPLC-MS es muy sensible y tiene ventajas sobre otros métodos para obtener información estructural de analitos [(1)].

El HPLC se ha aplicado ampliamente en los campos del análisis farmacéutico y el control de calidad de los alimentos, también es utilizado para la detección de curcuminoides. Esta es una técnica altamente sensible y selectiva para la determinación de sustancias. En estos últimos años, se han avanzado mucho en el desarrollo de este tipo de cromatografía para el análisis de componentes activos en la medicina clínica y tradicional. El logro en sensibilidad y selectividad para el análisis de componentes activos en los medicamentos por HPLC, alienta a desarrollar otros métodos nuevos para el análisis de la medicina a nivel mundial [(1)].

Sin embargo, requiere pasos de nebulización, vaporización, ionización de la muestra y costosos instrumentos, lo que hace que no tenga una disponibilidad en muchos laboratorios. Por lo tanto, aún se necesita un método simple con alta sensibilidad y de bajo costo para la determinación de estos curcuminoides [(1)].

En este trabajo, el objetivo es validar el método para el análisis de curcuminoides mediante HPLC, que integra eficacia de separación y alta sensibilidad de la detección química. Los parámetros analíticos, que afectarán la separación y detección química, serán investigados y el método aplicado se desarrollará con éxito al análisis de curcumina, detoxicurcumina y bisdetoxicurcumina en palillo comercial (*Curcuma longa L.*)

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Funes *et al*. (2015), en un artículo titulado "El desarrollo y validación de un método para la cuantificación de Atorvastatina en tabletas mediante HPLC-DA", la investigación fue de tipo analítico, experimental, prospectivo y diseño transversal, señala el método analítico que realizaron es aplicable para el análisis de Atorvastatina en tabletas mediante la separación cromatográfica en gradiente isocrático y que junto a la validación de los principales parámetros siguiendo la guía de la International Conference Harmonization - ICH demostraron que el método analítico es simple, exacto, preciso y específico para el objeto, soportando los resultados mediante las pruebas estadísticas aplicadas, en donde se cumplieron todos los criterios establecidos [(2)].

Palomino J. (2017), en su tesis "validación de un método analítico para la valoración de clorhidrato de terbinafina en gel 1% por cromatografía liquida de alta performance", desarrolló una investigación de tipo analítico, experimental, prospectivo y transversal y con un tipo de diseño experimental. El trabajo concluyó que el método analítico cumple con las pruebas de validación y confiabilidad realizada [(3)].

Guardia et al. (2014), en la tesis titulado "Validación de un método para la cuantificación de permetrina 1% en shampoo mediante cromatografía liquida de alta resolución" (HLPC), la investigación fue de tipo analítico, experimental, prospectivo y transversal y diseño aleatorio; El método demostró linealidad presentando un coeficiente de correlación: $r > 0,997$ y un coeficiente de determinación: $r^2 > 0,995$, ya que los resultados obtenidos fueron directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra; demostró precisión con una repetibilidad del método: RSD ≤ 2 % y la precisión intermedia dada por RSD entre analistas ≤ 3 %, demostrando que los resultados obtenidos fueron repetitivos y reproducibles. Además, el método demostró ser exacto porque el porcentaje de recuperación estuvo entre el 97% y 103%; el Test de T de Student dio un T exp < T tablas (0,7830 < 2,160), permitiendo la recuperación de la totalidad de analito presente en la muestra, comprobándose así su validez [(4)]. Concluyendo que el método analítico propuesto es selectivo, porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes presentes en la formulación del shampoo [(4)].

González Albadalejo, *et al.* (2015), en un artículo titulado "Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas" publicado en Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, señala sobre la curcumina, una molécula fascinante, cuyas propiedades medicinales cubren campos como cáncer y Alzheimer, además se describen sus propiedades biológicas, farmacológicas, químicas y fisicoquímicas así como las de algunos de sus derivados (los curcuminoides y hemicurcuminoides), en particular aquellos que contienen un heterociclo [(5)].

Quiroga *et al.* (2007), en un artículo titulado "Efecto de curcumina en células de mama humana ZR-75-1", publicado en Boletín Latinoamericano y del Caribe de Planta Medicinales y Aromáticas, señala que la curcumina, es un compuesto polifenólico, que se extrae de los rizomas de la *Curcuma longa* a los que le da el color amarillo característico y que ha sido utilizado como aditivo alimenticio. Posee actividad antiinflamatoria, antioxidativa, pro-apoptótica, antitumoral y anticancerosa. La gama glutamiltranspeptidasa (GGTP) es una enzima de membrana que metaboliza el glutatión, molécula con elevada capacidad antioxidativa como también es marcadora de estrés celular y de algunos cánceres. El articulo descrito, valora el efecto de la curcumina, en células ZR-75-1 con o sin la adición de Sulfato de Cobre, un agente oxidativo, sobre la proliferación, la actividad de la enzima GGTP, y la visualización de la apoptosis [(6)].

Freire González *et al.* (2014), en un artículo titulado "Caracterización fitoquímica de la *Curcuma longa* L.", publicado en Revista Cubana de Química, señala que la propagación del uso de la *Curcuma longa* L., en muchas localidades del municipio Santiago de Cuba, se produjo a partir de los asentamientos franceses, aunque es desconocida, de forma general, por la misma población, a pesar de que este es empleada masivamente como colorante alimenticio y en forma de suplemento o medicamento herbario, ya sea por sus beneficios en la prevención de diversas enfermedades degenerativas, el envejecimiento prematuro y el cáncer. Cabe destacar que el articulo realizo una caracterización fitoquímica del polvo del rizoma empleando métodos cromatográficos en capa fina y algunas soluciones de referencia, con el fin de identificar algunos metabolitos secundarios presentes en la misma y corroborar la variedad en cuestión [(7)].

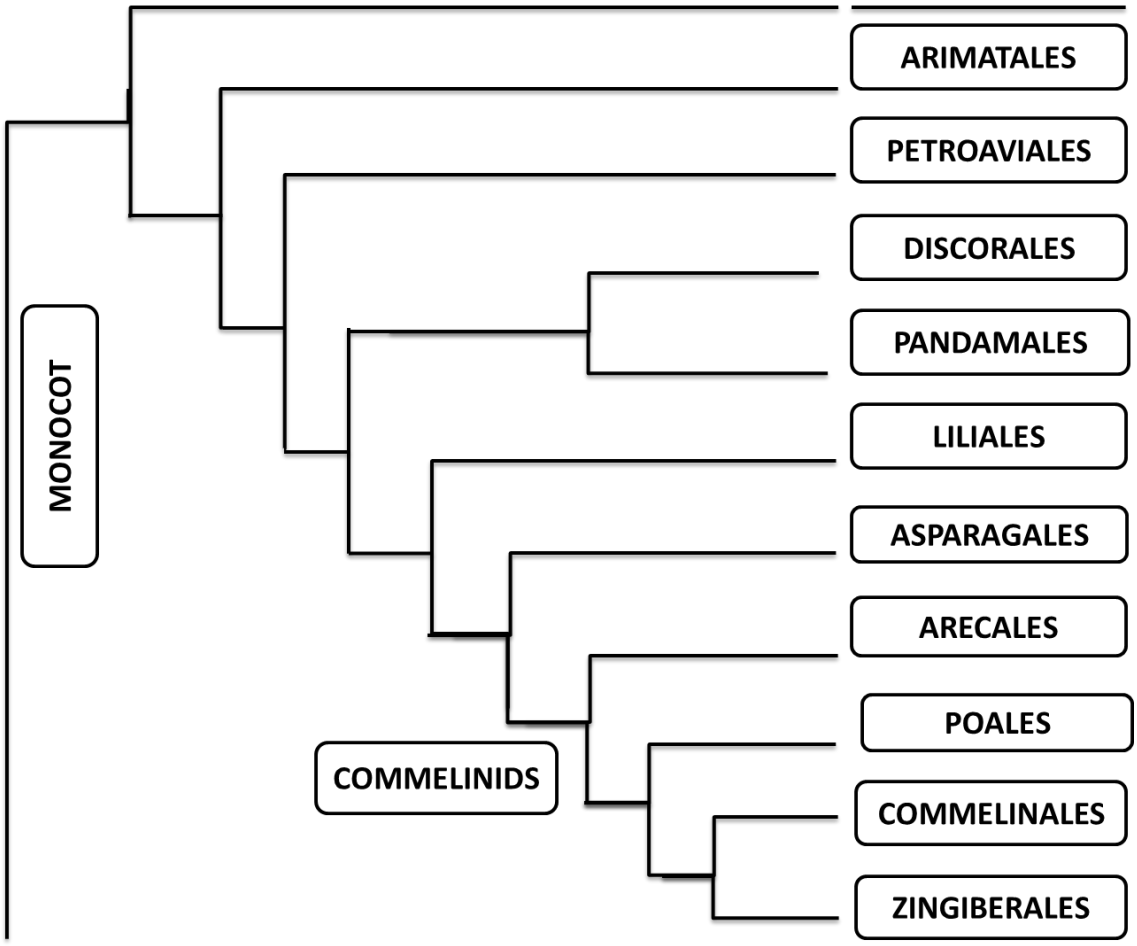
1.2. BASES TEÓRICAS

1.2.1. CÚRCUMA

a. Clasificación taxonómica

La especie botánica *Curcuma longa* L. (cúrcuma), según el Sistema de Clasificación APG III del año 2009, corresponde a una planta Monocotiledónea del Orden Zingiberales de la Familia *Zingiberaceae*. Del grupo de las Comelínidas, reconocidas por que las hojas bajo la luz ultravioleta presentan paredes celulares fluorescentes gracias a la presencia del ácido ferúlico, cumárico y salícico [15].

Figura 01. Sección del árbol filogenético de las Angiospermas según el Sistema de Clasificación APG III del 2009.



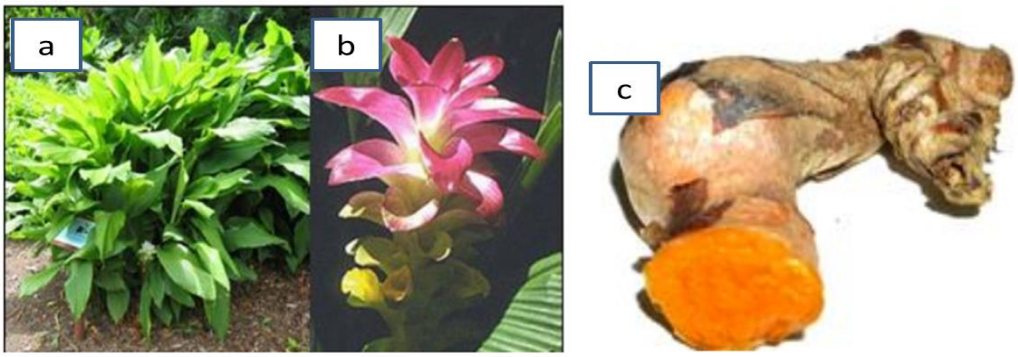
Fuente: Sistema lineal basado en Haston *et all* (2009) [16].

b. Descripción botánica

La cúrcuma es un triploide estéril (2n=3x=63), ya que posee tres juegos completos de cromosomas que raramente florece, y cuando echan flores, estas presentan un color

amarillo bajo tendiente al blanco, reunidas en brácteas de 3 a 5 flores. La inflorescencia es de color rosa intensificando su color en la parte extrema superior. No se le reconoce semillas por lo que la planta tiene una reproducción vegetativa por esquejes que nacen a partir del rizoma. Este rizoma de cúrcuma es muy requerido en el ambiente gastronómico, medicinal, alimentario y cosmético [15].

Figura 02. Imagen de la planta en estudio.



a) planta de cúrcuma. b) Detalle de la flor. c) Detalle del rizoma anaranjado.

c. Hábitat

La cúrcuma es una especie vegetal de clima tropical que se le encuentra desde Polinesia y Micronesia hasta el sudeste asiático, es originaria de la India (abunda en Sangli) y zona meridional de Vietnam. Crece en clima cálido (entre 20 y 30 °C) y húmedo (requerida para su desarrollo), requiere de un suelo ligeramente ácido (pH de 5 a 6), rico en limas, que sea fértil y bien drenado, abierto y con alta luminosidad [15].

d. Composición nutricional y compuestos característicos de la cúrcuma

Según la "*National Nutrient Data base for Standard Reference*" del Centro de información de alimentos y nutrición de la USDA, esta planta es rica en carbohidratos, potasio, fósforo y magnesio, así como de vitaminas C y E. pero de escasas calorías y grasas. [15]. En la tabla 1, se puede apreciar la composición nutricional de 100 g de cúrcuma, y por 3 g que equivalen a una ración por persona [15].

Tabla 01. Composición nutricional de 100 g de cúrcuma, y por 3 g que equivalen a una ración por persona**.**

Nutrientes	Unidad	Valor por 100 g	Valor por 3 g
Agua	G	12,85	0,39
Energía	Kcal	312	9
Proteínas	G	9,68	0,29
Lípidos totales (grasas)	G	3,25	0,10
Carbohidratos	G	67,14	2,01
Fibra dietética total	G	22,7	0,7
Azúcares totales	G	3,21	0,10
	Minerales		
Calcio, Ca	Mg	168	5
Hierro, Fe	Mg	55,00	1,65
Magnesio, Mg	Mg	208	6
Fósforo, P	Mg	299	9
Potasio, K	Mg	2080	62
Sodio, Na	Mg	27	1
Zinc, Zn	Mg	4,50	0,14
	Vitaminas		
Vitamina C total (ácido ascórbico)	Mg	0,7	0,0
Tiamina	Mg	0,058	0,002
Riboflavina	Mg	0,150	0,004
Niacina	Mg	1,350	0,041
Vitamina B-6	Mg	0,107	0,003
Folato, DFE	µg	20	1
Vitamina B-12	µg	0,00	0,00
Vitamina A, RAE	µg	0	0
Vitamina A, IU	IU	0	0
Vitamina E (alfa-tocoferol)	Mg	4,43	0,13
Vitamina D (D2 + D3)	µg	0,0	0,0
Vitamina D	IU	0	0
Vitamina K (filoquinona)	µg	13,4	0,4
	Lípidos		
Ácidos grasos saturados, total	G	1,838	0,055
Ácidos grasos monoinsaturados, total	G	0,449	0,013
Ácidos grasos poliinsaturados, total	G	0,756	0,023
Ácidos grasos trans, total	G	0,056	0,002

Fuente: *National Nutrient Database for Standard Reference.* [17]

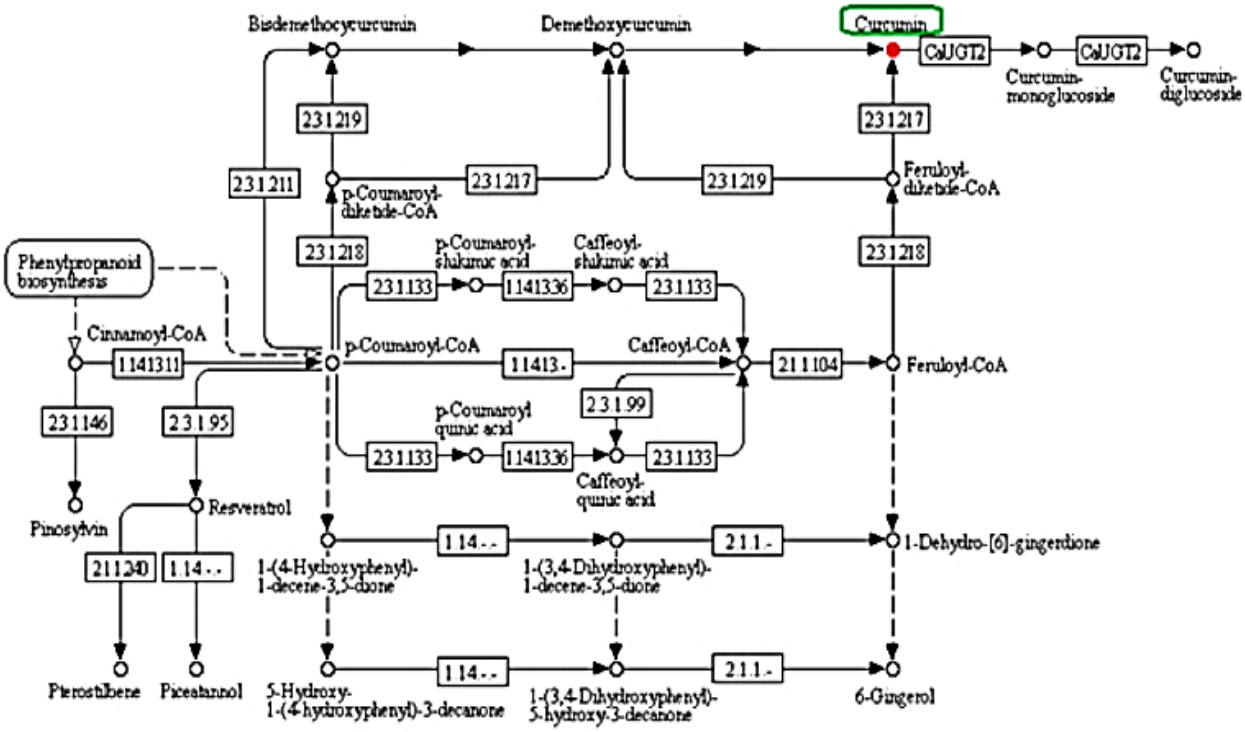
e. Compuestos químicos presentes en la cúrcuma

En la cúrcuma se han identificado metabolitos secundarios de tipo fenólicos y aceites volátiles a los cuales se les atribuye las propiedades curativas [15].

Los polifenoles, derivados diarilmetálicos del grupo de los curcuminoides, que confieren color amarillo-anaranjado al rizoma y representa un 2 - 9% de la masa de la planta. Siendo los curcuminoides mayoritarios el diferuloilmetano o curcumina I (77%), detoxicurcumina o curcumina II (17%), bisdetoxicurcumina o curcumina III (3%) y la recientemente descubierta ciclocurcumina [15].

El curcuminoide curcumina se sintetizó por primera vez en el laboratorio de S. Kostanecki en Berna en 1913, cuya fórmula molecular es $C_{21}H_{20}O_6$, es un estilbenoide, undiarilheptanoide derivado de la ruta de Shikimato /Acetato-malonato (Figura 3), es un polvo cristalino insoluble en agua, pero soluble en etanol y ácido acético [15].

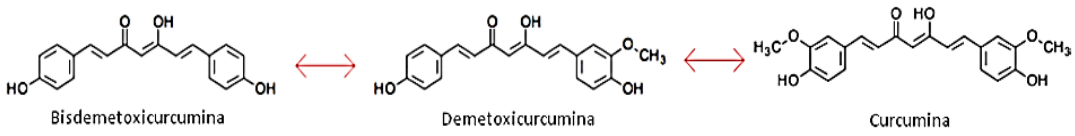
Figura 03. Síntesis de curcumina por la ruta de biosíntesis de estilbenoides, derivado de la ruta del Shikimato /Acetato-malonato.



Fuente: www.genome.jp [18]

En su ruta biosintética por acción de una hidrolasa se obtiene bisdetoxicurcumina que luego deriva en detoxicurcumina de la cual por acción de la enzima O-metiltransferasa (OMT) sé obtiene curcumina como sé puede apreciar en la figura 4 [15].

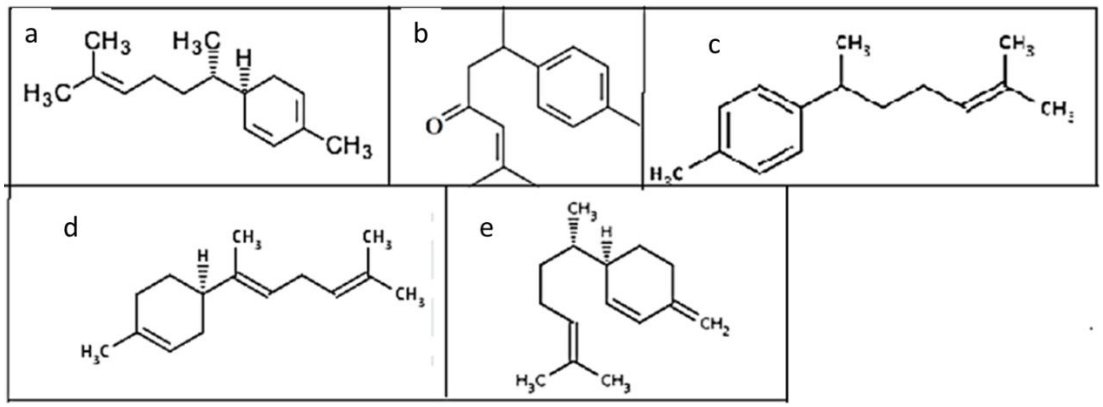
Figura 4. Derivación de la síntesis de los curcuminoides más importantes de la *Curcuma longa* (cúrcuma).



La presencia de aceites volátiles tipo terpenoide se encuentra en una concentración de 5%, dan olor característico al rizoma. Contiene diferentes sesquiterpenos cetónicos con capacidad antioxidante característicos de la especie (Figura 5), como son la ar-tumerona (máximo de 25%), los isómeros α-turmerona (atlantona) y β-turmerona (curlona) (máximo de 30%) y zingibereno (máximo de 25%). Además, presenta cariofileno, α-curcumeno, bisaboleno y β-sesquifelandrenendreno, compuestos sesquiterpenoides son potentes moléculas antioxidantes [15].

Al compuesto ar-turmerona se le atribuye la actividad alelopática de la cúrcuma y el zingibereno un sesquiterpenoide bisabolano, cuya presencia es compartida por el jengibre [15].

Figura 5. Estructura química de compuestos presentes en la *Curcuma longa* de zingibereno.



a) zingibereno, b**)** ar-turmerona, c) α-curcumeno, d), α-bisaboleno y e) β-sesquifelandrenendreno.

f. Usos gastronómicos

Este rizoma de color anaranjado es la parte preferida de la planta por sus usos en el mercado o la industria. De amplio uso en culinaria popular en la región de la selva peruana y en general en la gastronomía (industrialmente se comercializa como E-100), el polvo seco y molido ha sido industrializado y consumido como aliño, en fitomedicina, cosmética natural y en ritos espirituales [(15)].

En la industria alimentaria esta resina fenólica es saborizante y colorante, que sirve para aromatizar y usada para colorear la mantequilla, quesos, otros lácteos, conservas, mostaza, palomitas de maíz de colores, cereales, sopas, caldos, productos cárnicos y productos industriales como chifles, papas y otros bocaditos [(15)].

Los árabes y persas tenían predilección por la cúrcuma a la que llamaban kourkoum apreciaban su color, y consideraban que era una variedad de azafrán, posteriormente los españoles la acogieron llamándola cúrcuma o azafrán de las Indias. El nombre inglés turmeric, data del siglo XVI y parece proceder del francés *terre-merite* y este a su vez del latín *terra merita* o *mérito de la tierra.* También en esa época era conocido como crocusindicus, turmeracke [(15)].

La Food and Drug Administration - FDA de los Estados Unidos ha declarado la curcumina como “un producto seguro”, y aceptado como colorante alimenticio y saborizante, y se recomienda que no se ingiera más de 1mg de curcumina/Kg de peso y 0,3mg de cúrcuma por Kg de peso [(15)].

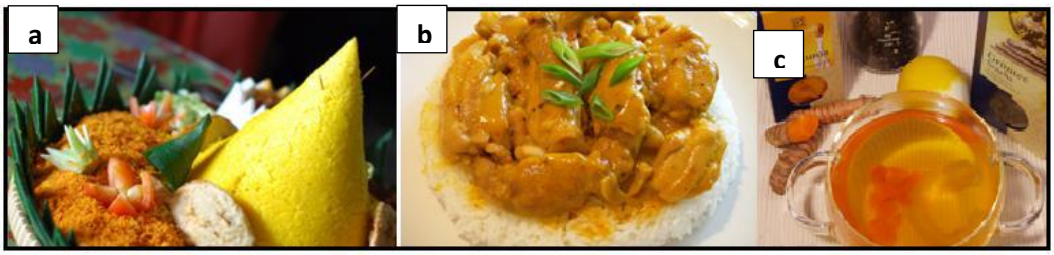
También de los lípidos y aceite de los rizomas secos y molidos de la cúrcuma se usa la oleorresina obtenida por extracción alcohólica (o con acetona, diclorometano, 1,2-dicloroetano, metanol, etanol, isopropanol y hexanos), con un contenido entre 35-55% de curcuminoides y como máximo 25% de aceites volátiles se presenta como un aceite denso de color amarillo terroso, semisólido o pastoso. También se comercializa aceite menos denso con un 6 al 15% de curcuminoides y no más del 10% de aceites volátiles. El producto debe ser almacenado en ambiente seco y frío (de 15 a 20°C) al resguardo de la luz, calor y el aire [(15)].

La cúrcuma se incluye dentro de las plantas aromáticas más conocidas como especias, siendo una de las más consumidas mundialmente y la que más se exporta de los países productores predominantemente asiáticos y africanos (Madagascar, Islas Comoras y

Tanzania). Los rizomas aromáticos de una fragancia suave, de sabor picante y amargo y con ligeros tonos de naranja y jengibre. En estado fresco, la fragancia es más aromática. Es uno de los componentes principales del curry.

En el sudeste asiático, se prefiere comer la cúrcuma fresca que la seca, así también en en Tailandia, que se añade a platos y guisos, en Indonesia, hay un plato típico de arroz que amarillo (Figura 6 A). En la cocina marroquí, se sazonan las carnes, gambas y vegetales. También se usa en la región del Caribe y el norte de África mientras que, en Okinawa, Japón se sirve como té (Figura 6 C). En la cocina occidental es menos incluida, pero es ingrediente del curry (Figura 6 B) y de salsas [15], sin embargo, su uso como aliño está muy difundido en las ciudades de la selva peruana.

Figura 06. Imágenes sobre la variedad de platos en los que se utiliza la cúrcuma.



a) Plato típico de Indonesia conocido como arroz amarillo o Nasi Kuning. b) Arroz con pollo y curry. c) Té de cúrcuma.

La cúrcuma realza el sabor de las comidas y les dan un aroma y sabor exquisito a las comidas como en países del medio oriente Lo cierto que ayuda a la digestión. Pero muy aparte del placer sensorial la cúrcuma es un alimento con propiedades medicinales [15]

La cúrcuma puede combinarse con el onoto o achiote (*Bixa Orellana* L.), una especie arborescente de las regiones intertropicales de América, presenta semillas de color rojizo y se utilizan también como colorante natural (E160b), solo o asociado con la cúrcuma (E-100) [15].

- **Usos medicinales**

En medicina tradicional se usa para consumo interno infusiones del rizoma en polvo o triturado, para su uso externo se suele preparar tinturas con alcohol al 70% o en extractos secos extraídos con etanol al 96% [15].

El rizoma de la cúrcuma fue adoptado como producto medicinal por el Comité de Productos Medicinales Herbales (*Committeon Herbal Medicinal Productos*-HMPC) el 12 de noviembre de 2009. Forma parte de la medicina tradicional china, hindú y ayurvédica) para **problemas digestivos, por su actividad antiinflamatoria y capacidad de cicatrización,** también se ha empleado en casos de ictericia y para mejorar la función hepática, en desordenes respiratorios, afecciones de la piel como psoriasis o eczemas, prevención de cáncer y capacidad antioxidante [(15)].

La curcumina tiene varias acciones medicinales probadas científicamente. Un estudio con 45 pacientes que padecían artritis reumatoide, que recibieron tratamiento con dosis de 500 mg por día de curcumina, mostraron disminución significativa de los niveles inflamatorios sin causar efectos adversos [(15)]. Por eso es usado en caso de artrosis, prevención de arteriosclerosis, esclerosis múltiple y psoriasis al modular la señal de las citoquinas, un tipo de moléculas proinflamatorias e inhibir la síntesis de prostaglandinas antioxidante [(15)].

Se conocen que en su efecto hepatoprotector la cúrcuma aumenta el contenido de glutatión y la actividad de la glutatión-s-transferasa hepática que ayuda a hacer frente al daño de las toxinas y los radicales libres. Considerándosele como un poderoso antioxidante que influye sobre la expresión de enzimas relacionadas con procesos REDOX, como la glutatión-sintasa (GTS) o el citocromo P450 oxidasa (CYP-450) capaces de neutralizar las especies reactivas de oxígeno. También se conjuga la curcumina con los fosfolípidos mejorando su absorción [(15)].

También tiene efectos anticancerígenos, es capaz de reducir el crecimiento de tumores y modular los problemas secundarios asociados al cáncer como fatiga, depresión o insomnio; la curcumina inhibe directa e indirectamente a la ciclooxigenasa-2 (COX-2), interviene en la cascada de la inflamación y reduce el crecimiento celular inhibiendo la expresión de Interleucinas IL-1 ß, IL-6 y el factor de necrosis tumoral-α (TNF- α) [(15)].

La curcumina tiene una poderosa acción antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de bacterias, virus y hongos (incluyendo *Candida albicans*, *Candida kruseii* y *Candida parasilosis*) [(15)].

La curcumina tiene una función protectora de la mucosa gastrointestinal al inhibir la activación de varios factores de transcripción que tienen un papel clave en la

inflamación de los intestinos, como son el factor nuclear Kappa-ß (NFk ß) o las ß-catequinas. Ha sido utilizada desde tiempos ancestrales frente a gastritis o acidez incrementa la producción de moco que protegen las paredes del estómago. También ayuda al metabolismo de las grasas estimulando el flujo biliar hacia el intestino [15].

En uso en enfermedades psiquiátricas está comprobado que la curcumina puede prevenir la acumulación de placas beta-amiloide, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer. Estudios *in vivo* han demostrado que la curcumina reduce el estrés, mejorar la irritabilidad y la ansiedad, modular la depresión y los mecanismos de neurotransmisión modulando las señales de trasmisión neuronal [15].

Estudios en animales han mostrado que la curcumina se metaboliza rápidamente, se conjuga en el hígado y se excreta por las heces, teniendo por tanto una limitación en su biodisponibilidad [15].

La dosis diaria recomendada es de 300 a 600 mg/día de extracto de raíz de cúrcuma estandarizado al 95% de curcuminoides, o consumiendo la cúrcuma diariamente con los alimentos. No debe consumirse mayores dosis porque refuerza el efecto de anticoagulantes y en dosis elevadas es contraproducente en casos de cálculos biliares o toxicidad hepática grave. No se debe usar en dosis medicamentosas en embarazadas, mujeres que dan de lactar y niños. Por otro lado, a dosis muy altas puede dar lugar a irritación de la mucosa estomacal y deben evitarse en pacientes con úlcera gástrica o intestinal [15].

- **Usos en cosmética**

En la India la pasta de cúrcuma elimina el pelo del cuerpo, en casos de quemaduras solares, en piel dañada y envejecida. Es un ingrediente que puede encontrarse en cremas como astringentes, o aceite esencial aromatizante. En el tratamiento capilar se utiliza para el tratamiento de la caspa, colorear el cabello o como estimulante del crecimiento capilar [15].

g. Rituales espirituales en la historia de la cúrcuma

En las bodas hindúes la cúrcuma se utiliza para cubrir el cuerpo de la novia y en la frente de los bebes la cúrcuma se cree que da buena suerte [15].

Se le conoció igualmente como sal de Oriente y en los tiempos bíblicos se empleaba como perfume y especie. La referencia más antigua data de un herbario asirio del año

600 A.C, donde los escritos la reportan como planta colorante. Dioscórides reporta que es de origen hindú y de sus virtudes depilatorias y su gusto amargo. En la Edad Media Marco Polo menciona la existencia de la cúrcuma que crecía en la región de Fu-Kien y la comparaba a la vez que la diferenciaba del azafrán en color y olor y su valor era muy cotizado, pero más barato que el azafrán por lo que se proliferó su consumo en la preparación de platos y salsas. La cúrcuma ha estado presente en la cultura de muchos países por más de 4000 años y sigue siendo en la India, Sri Lanka y otros países asiáticos un ingrediente indispensable en la culinaria de la cocina. El mayor proveedor de cúrcuma a nivel mundial es la India, seguido por Pakistán, Jamaica, China, Bangladesh, Taiwán y Haití [(15)].

h. Especies de cúrcuma

Se conocen diferentes tipos de cúrcuma, además de la *Curcuma longa* L. (cúrcuma propiamente dicha) la *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *(*cúrcuma de Java) llevada a Europa por los neerlandeses donde también se conoce como "temullawak" y la *Curcuma cedoaria* (Christm.) Roscoe procedente del Himalaya donde preparan ensalada de las hojas de la planta. Según Van Hellemont, la cúrcuma de Java es la especie que tendría una mayor concentración de aceites volátiles y por tanto un mayor efecto colagógico y colerético por lo que, es requerida más para molestias gástricas que la *Curcuma longa,* esta última de mayor requerimiento culinario, sin que por eso se desmerezca sus propiedades colagógicas y coleréticas, además de una gran cantidad de otras cualidades farmacológicas que de momento no se han comprobado en la cúrcuma de java [(15)].

i. Cultivo de la cúrcuma

El mayor país productor de cúrcuma es la India, con el 90 % de la cúrcuma del mundo, la misma que es cultivada desde 3000 A.C por la civilización Harappa [(15)].

Su cultivo de propagación se da a partir de los rizomas, (20 y 50 g cada una). La reproducción se da por yemas o dedos que surgen en el propio rizoma en el último año de crecimiento y que renueva la planta. El cultivo requiere un distanciamiento de los brotes de siembra de 0,5 m entre filas y de 0,3 m entre plantas, esto da una densidad de 66,667 plantas /ha maduras, luego de 7 a 10 meses de desarrollo según las condiciones del clima. Cada planta rinde aproximadamente 0,5 kg, equivalente a 20 TM de cúrcuma fresca por hectárea o 6 TM de cúrcuma seca por ha [(15)].

- **Cosecha y recolección**

Esta planta perenne se siembra en India entre los meses de abril y mayo, las hojas aparecen a los 30 días aproximadamente, y se cosecha cuando las hojas se marchitan tornándose amarillentas en la época seca (duración del cultivo 270-365 días). La recolección se puede hacer con cosechadoras de tubérculos o en forma manual. La postcosecha consta de los siguientes pasos [15]:

- Limpieza de los rizomas inmediatamente que se cosecha, en el campo se retiran las raíces y tierra adherida a ellos
- Lavado de los rizomas con agua limpia no contaminada, para retirar la tierra. Se hace de forma manual o poniendo los rizomas en una máquina mezcladora eléctrica con agua y se van lavando con el movimiento.
- Cortado o troceado de los rizomas utilizando para ello una maquina especial.
- Secado para eliminar la humedad residual del rizoma, la cual corresponde a la pérdida de peso de 10 – 12 % al final del proceso. Esta etapa puede realizarse de varias formas:
  - ✓ Secado al sol: aprovechando la energía solar, se coloca en pedazos sobre superficies adecuadas para lograr un secado homogéneo, sin embargo, este método hace perder color y baja el contenido de curcumina.
  - ✓ Secado con otras fuentes de energía: se pueden deshidratar en secadores tipo SAMOA, utilizadas para el secado del "cacao". Este procedimiento tiene la ventaja de mantener el color y porcentajes adecuados de curcumina.

Esta planta, se puede cultivar en altitudes entre 0 m y 2.000 m S.N.M, en las estribaciones del Himalaya. Específicamente, requiere un clima caliente y húmedo. Los rendimientos de la cúrcuma fresca cruda varían entre 7-9 T/ha, cuando este se da como un cultivo de secano, y entre 17 a 25 T/ha cuando se cultiva bajo riego, pero se pueden obtener rendimientos de hasta 50 T/ha. Lo rendimientos de las especias secas varían entre 0,4 a 1,7 T/ha [15].

1.2.2. La cromatografía

Según la definición de la IUPAC, la cromatografía es un método, muy útil para la separación de los componentes de una muestra, consiste en distribuir en dos fases, una es estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel y la fase móvil puede ser líquido o gaseoso [8].

a. Tipos de cromatografías

La elección de las diferentes técnicas de cromatografías (Tabla 2), responde a una característica del analito o del proceso de separación. Dentro de la cromatografía liquida destaca la cromatografía liquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), que es la más empleada en la actualidad [9].

Tabla 2. Clasificación de tipos de cromatografías por su disposición, su fase móvil y estacionaria.

Tipos	Disposición	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía en papel.	Vertical	Líquido	Moléculas de agua contenidas en celulosa.
Cromatografía de capa fina.	Vertical	Líquido	Solido
Cromatografía de Gases.	Cromatografía en Columna.	Gases	Solido o Líquido
Cromatografía liquida de fase inversa.	Cromatografía en Columna.	Líquido Polar	Solido o Líquido menos Polar.
Cromatografía liquida de fase normal.	Cromatografía en Columna.	Líquido menos Polar.	Solido o Líquido Polar.
Cromatografía liquida de intercambio iónico.	Cromatografía en Columna.	Líquido Polar	Solido
Cromatografía liquida de adsorción.	Cromatografía en Columna.	Líquido	Solido
Cromatografía de fluidos superficiales.	Cromatografía en Columna.	Líquido	Solido

b. Cromatografía liquida de alto rendimiento

Dentro de la columna del HPLC, se dan varias interacciones químicas con los componentes de la muestra a analizar. Básicamente es un sistema compuesto por: una columna empacada con la fase estacionaria, la fase móvil, la bomba, el inyector, columna de separación, detector y un ordenador [9]. Luego el analito es forzado a pasar a través de la columna empacada, con ayuda de la fase móvil liquida, la cual es bombeada a alta presión. La muestra se inyecta en pequeños volúmenes a la corriente

de la fase móvil, retardándose su flujo por las interacciones químicas de los analitos, con la fase estacionaria a lo largo de su recogido por la columna. Tiempo que corresponde al tiempo de retención que depende: de la naturaleza química, de los productos, la fase estacionaria y la composición de la fase móvil [9].

c. Tipos de HPLC

- **Cromatografía en fase normal**

La cromatografía de fase normal se desarrolla sobre fases estacionaria hidrofílicas, sílice o alúmina microporosas y como fase móvil solventes de baja polaridad. Este sistema funciona cuando el analito es de alta o mediana polaridad o por separación de isómeros posicionales con sustituyentes. Si el analito es de alta polaridad queda retenido por más tiempo; sin embargo, si se agrega un solvente polar, el tiempo de retención se verá disminuido. Por lo contrario, su mayor inconveniente es la alta actividad del material de relleno que tiende a absorber agua y solventes polares en su superficie [9].

- **Cromatografía de fase reversa**

La cromatografía de fase reversa (Reversed Phase Chromatography, RPC) corresponde a un tipo de cromatografía donde la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La RPC es una técnica de separación útil para discriminar componentes muy similares en sus propiedades, por ej. de proteínas cuya diferencia es mínima solo por un aminoácido o isómeros conformacionales de péptidos [9].

d. Validación de métodos analíticas

La validación de un método analítico es un proceso que, por estudios experimentales, se evalúa criterios para ver si el método satisface los requisitos para la aplicación destinada de la técnica analítica elegida [10]. Ésta se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan [8].

Cada vez que se requiere un nuevo producto es necesario su identificación y cuantificación con un alto grado de confiabilidad utilizando métodos analíticos ya sea que este sea una materia prima o un principio activo incorporado en una formulación. En un ensayo de validación se requiere medir los siguientes parámetros: Selectividad o Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud y Sensibilidad [8].

- **Selectividad o especificidad**

Este parámetro se refiere a la capacidad del método para producir una señal medible que corresponde solo a la presencia del analito, sin que otro componente pueda interferir, en la matriz de la muestra. Ya que para el caso de los fármacos el componente activo siempre está acompañado de los excipientes o de productos de degradación, subproductos o productos laterales de síntesis de una droga, metabolitos del mismo analito en un fluido biológico, etc [8].

En el caso del análisis de una droga o fármaco, resulta de gran utilidad contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación. De ser así, la selectividad puede controlarse simplemente por la adición de, por ejemplo, 1% de cada posible interferente al estándar de droga pura, verificando la separación cromatografía [8].

En el caso que los productos de descomposición sean desconocidos o no puedan aislarse, el camino a seguir podría comprender los siguientes pasos (sin descartar una búsqueda bibliográfica previa que permita orientar o sustentar los ensayos a efectuar):

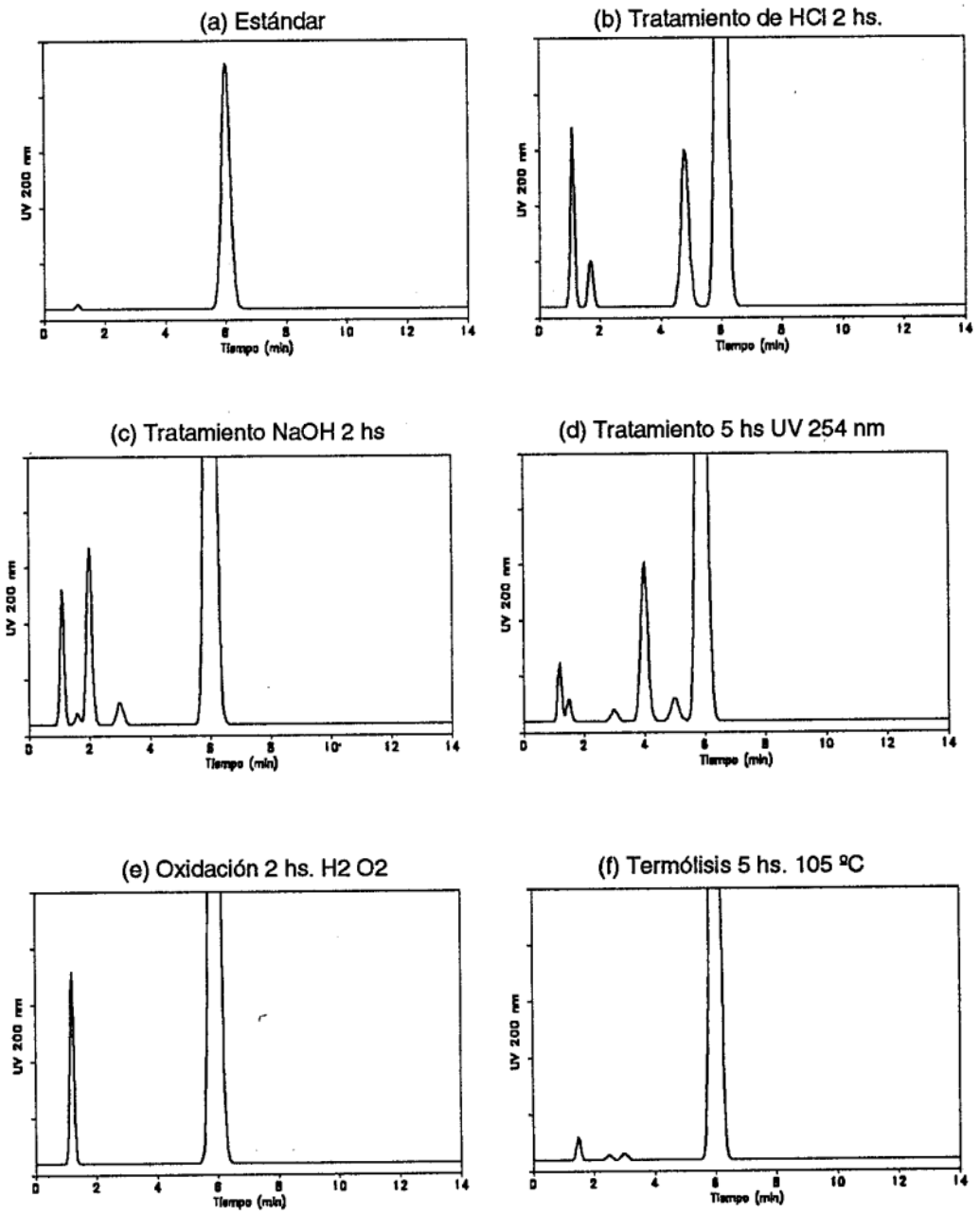
En Primer lugar, se evalúa la estructura química de la droga y se postulan las posibles rutas de degradación y métodos de ataque. Se pasa a un ensayo de degradación artificial, por ejemplo [8]:

1. **Termólisis,** Producida por calentamiento de la droga a la temperatura fijada (por ejemplo 105°C)
2. **Hidrólisis,** Por calentamiento a reflujo con agua durante 1 hora.
3. **Hidrólisis alcalina**, por calentamiento a reflujo con NaOH 1 N durante 1 hora.
4. **Hidrólisis ácida,** por calentamiento a reflujo con HCl 1 N durante 1 hora.
5. **Fotólisis,** por exposición de la droga pura y de una solución de la misma a la luz UV de onda corta y a la luz solar directa o indirecta.
6. **Oxidación,** por calentamiento en Baño María de una solución de la droga con gotas de agua oxigenada o por burbujeo de oxígeno.

De ser necesario se neutraliza la droga degradada artificialmente (para evitar al maltrato columnas y equipos) y se analiza por el método propuesto. En general se recomienda que la degradación no sea mayor del 20 % de la concentración inicial, de

modo que puede ser conveniente repetir alguno de los ensayos empleando condiciones más suaves o bien más enérgicas. La Figura 07 muestra un ejemplo de este procedimiento [8].

Figura 07. Degradación artificial de la base nitrogenada A-351 por el esquema propuesto. Columna: Superspher RP-18, con buffer fosfatos-metanol (40:60). TEA 30mM, pH 3.0 a 1.0 mL/min. [8]



En este análisis debe completarse con el estudio de la pureza u homogeneidad del pico correspondiente al analito. En estudio consiste en determinar si existe algún producto de descomposición que produzca un pico superpuesto al del analito y que no alcance a evidenciarse. Para esto es conveniente complementar este estudio con un método alternativo (TLC o GLC) y la comparación de resultados, especialmente en cuanto al número y proporción de los componentes de la muestra degradada [8].

En este tipo de ensayos resulta muy ventajoso el empleo del detector de ordenamiento de fotodiodos, ya que complementa la información convencional con la relativa a la pureza de picos. Este detector tiene ventaja ***multiplex*,** es decir, puede medir la señal no solo a una longitud de onda discreto sino el espectro de absorción completo en tiempo real (centésimas o milésimas de segundo), de modo que, a las dimensiones habituales de tiempo y absorbancia, se agrega una tercera, la longitud de onda, permitiendo apreciar detalles que escapan a detectores convencionales. Expresando de otro modo, con un detector convencional se monitorea la separación a una longitud de onda, la estimada como más conveniente [8].

Finalizado el ensayo, la información que pudiera haberse obtenido a otra longitud de onda estará perdida. Con el detector de ordenamiento de fotodiodos se monitorea y almacena (en un soporte magnético) la información relativa a todo el espectro de absorción, de modo que esa información puede ser posteriormente recuperada y manipulada [8].

Los ensayos de degradación artificiales descritos permiten no solo el mejor conocimiento y eventual corrección de la técnica empleada, sino que también orientan al desarrollo de nuevas formulaciones de productos, indicando las condiciones de mayor agresividad, las mejor soportadas por la sustancia, condiciones de almacenamiento, tipo de envase, etc. (pH, labilidad a la hidrolisis. fotolisis, oxidación, etc) [8].

En el caso de un producto farmacéutico, deberá considerarse no solo la inyección de droga y placebo por separado y en conjunto para asegurar la selectividad de la medición, sino también la preparación de un placebo degradado y la degradación del producto final, acondicionada en su envase definitivo. En el caso de una validación

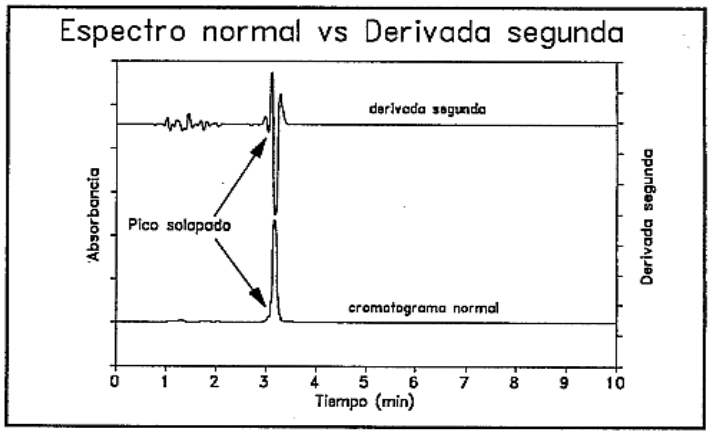
retrospectivo pueden en cambio utilizarse productos vencidos o en el límite de su periodo de vencimiento [8].

En el estudio de fluidos biológicos o de muestra naturales, donde la complejidad de la matriz dificulta la identificación inequívoca de los picos, deberá recurrirse a otro tipo de métodos para la determinación de la selectividad. Una interesante revisión de las posibilidades, completada por referencias bibliográficas fue efectuada por Scoble y Brown [8].

Para el caso de la especificidad, su determinación no siempre sigue modelos sistematizados, ya que muchas veces se vale del arte e ingenio del analista, pudiéndose tomar como referencias [8]:

1. Tiempo de retención. Sirve como primera base para la identificación del pico, pero esto a veces no resulta suficiente. En el caso de disponer de estándares, la coinyección de estos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes (observando la posible aparición de ensanchamiento de bandas, hombros, si es posible por derivación de la señal – Figura 08-, etc) puede servir como primera aproximación.
2. La modificación de las condiciones cromatografías (proporción de solventes o modificaciones, pH, etc) y la observación de los resultados complementan el ensayo anterior.

Figura 08. Derivada segunda de un cromatograma mostrando bandas superpuestas. Cada mínimo de la derivada segunda corresponde a un máximo, o a un hombro en el cromatograma, resaltando bandas parcialmente solapadas. [8]



3. La caracterización espectro, por empleo de detectores de ordenamiento de fotodiodos o el barrido espectrofotométrico a caudal detenido o el empleo de cocientes de absorbancia brinda apoyo adicional.
4. Pueden emplearse detectores de mayor selectividad (y en general mayor sensibilidad), como los de radiactividad los de fluorescencia (ya sea haciendo uso de la fluorescencia nativa de algunos compuestos o por reacciones de derivación para la información de compuestos fluorescencia) o los de detección electroquímica empleados para la oxidación o la reducción. Todos estos detectores permiten suponer la presencia de ciertos grupos funcionales en la molécula del analito.
5. En ocasiones el analito requiere ser digestado por procesos enzimáticas, para ello el fluido se incuba con la enzima específica, en condiciones adecuadas de temperaturas y pH, y la inyección del producto para comprobar la reducción o desaparición del sustrato pueden brindar un gran apoyo, debido a la selectividad propia de la enzima.
6. Las reacciones degradativas (oxidación, reducción, fotolisis, etc) empleadas para comprobar la disimulación o desaparición de la señal del analito en el cromatograma pueden apoyar la hipótesis de la presencia de un compuesto con determinados grupos funcionales en el pico a evaluar.
7. Finalmente, existen técnicas complementarias, consistentes en el aislamiento de la fracción correspondiente al analito y la aplicación de técnicas espectroscópicas o bien sistemas de acoplamiento directo: LC-IR, LC-MC, etc. Referencias específicas para sistemas cromatográficos y detectores no convencionales son recopilados bienalmente por Analytical Chemistry y su lectura es recomendada para el analista interesado en estas técnicas concretas.

- **Linealidad**

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Es perfectible de hacer si se va a trabajar con un solo estándar en los análisis de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez. Sin embargo, en este caso, conjuntamente se determina el *rango lineal*, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado

y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar [8].

Se requiere de al menos cinco diluciones de un estándar, que contengan las concentraciones de trabajo con un incremento de al menos 50% sobre el límite superior y un defecto de 50% por debajo del límite inferior [8].

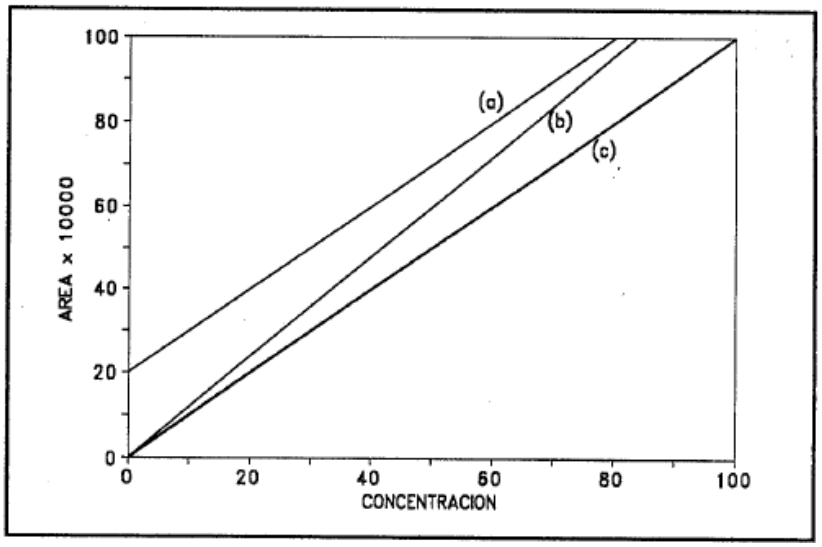
Estas soluciones se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión **Y = bX + a** sobre los puntos individuales sin promediar por el método de los cuadrados mínimos. Posteriormente se grafica para su documentación [8].

$$b=\frac{\sum X_i \quad Y_i - \frac{\sum X_i \ \sum Y_i}{n}}{\sum X^2{}_i - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \qquad a=\frac{\sum Y_i \ - b \sum X_i}{n}$$

Siendo **a** y **b** los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X_i, en la concentración e Y_i, el valor medido en el ensayo i [8].

En muchos casos, interesante comparar los resultados de la recta de regresión obtenida sobre el analito puro, con la correspondiente a analito + matriz (ver Figura 9).

Figura 9. Efectos de matriz, (a) aditivos y (b) multiplicativos, en comparación con (c) el estándar puro. [8]



La no correspondiente de las rectas indica problemas por efecto de matriz y está relacionada con la exactitud del método en cuestión. Estos efectos de matriz pueden clasificarse de acuerdo con su naturaleza en *adictivos y multiplicativos*. Los aditivos se refieren a un desplazamiento positivo del cero en presencia de la matriz y los multiplicativos a un cambio de la pendiente [8].

Independiente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado (por ejemplo, p = 0,05):

- **Del coeficiente de regresión lineal (r):** se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, **Y = b X +a**.
- **De la pendiente (b):** se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método o para evaluar la correlación de diferentes métodos.
- **De la ordenada al origen (a):** se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjuntarse únicamente a un error aleatorio.

Así,

$$r=\frac{\sum X_i \quad Y_i - \frac{\sum Xi \ \sum Yi}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2{}_i - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right)\left(\sum Y^2{}_i - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

El valor **r** = 1 indica una recta perfectamente lineal, r = - 1 una recta perfectamente lineal dependiente negativa y r = 0 la no correlación entre X e Y. En la práctica, r es generalmente mayor de 0.99 y los valores menores de 0.90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t_r, con n - 2 grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido [8].

En este caso, la hipótesis nula es la no correlación entre X e Y. El valor observado de $\mathbf{t_r}$ es mayor q t_{tabla}, se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada:

$$t_r=\frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

El límite de confianza para el estimador de la pendiente (**b**) se calcula en función de su varianza $\mathbf{S_b}$:

$$S_b = \sqrt{\frac{S^2{}_{x,y}}{\sum X^2{}_i - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}} \qquad S^2{}_{x,y} = \frac{\sum Y^2{}_i - a\sum Y_i - b\sum X_i\, Y_i}{n-2}$$

Luego, Los límites de confianza de la pendiente corresponden a:

Intervalo de confianza de b = b ± t . $\mathbf{S_b}$

Por su parte, el límite de confianza del estimador de la ordenada al origen (a) se calcula en función de su varianza S_a

$$S_a = \sqrt{S^2{}_b \frac{\sum X^2{}_i}{n}}$$

Intervalo de confianza de a = a ± t . $\mathbf{S_a}$

Puede también evaluarse el residuo, definido como la diferencia entre la respuesta medida en cada punto de la curva y la calculada a partir de la ecuación de la curva. El residuo indica el acercamiento al ajuste predicho, siendo sus características ideales [(8)].

- Valor pequeño del residuo.
- Consistencia de magnitud del residuo.
- Ausencia de tendencias en su signo (±).

- **Precisión**

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea [(8)].

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ, estimada analíticamente por s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). El estimulador de la desviación estándar se calcula como [(8)]:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y $\overline{X}$ el estimador de la medida poblacional μ, calculado como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$RSD = \frac{S \cdot 100}{\overline{X}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación estándar relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media) [8].

En el caso muestras escasas, que no permiten efectuar más de 2 ó 3 determinaciones, la estimación de la desviación estándar seria incierta. En estos casos puede recurrirse a un ‘‘estimador agrupado’’: se efectúan mediciones por duplicado o triplicado en diferentes muestras y se calcula la desviación estándar como [8]:

$$S = \sqrt{\frac{1}{N-g} \sum_{j=1}^{g} \sum_{i=1}^{n} (X_i - \overline{X}_i)^2}$$

Siendo **N** el número total de determinaciones, **g** el número de muestras y **n** el número de determinaciones sobre cada muestra [8].

En este caso, debe tenerse en cuenta que **s** varia con la concentración, de modo que, de ser muy diferentes, deberán agruparse por rangos bajo, medio y alto y no deberán agruparse valores de **S** muy disimiles [8].

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre:

a) **El sistema**, evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar.

b) **El método**, evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento. Así, por ejemplo, resulta necesario considerar la imprecisión causada por las diluciones, un factor frecuentemente olvidado [(8)].

En este caso, la precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día, diferente instrumento). El cociente repetitividad/reproducibilidad es un parámetro muy útil para evaluar la precisión de un método analítico. Su valor, según estudios realizados por la AOAC esta normalmente comprendido entre 1.5 y 2. Valores mayores de 2 pueden indicar un método muy ‘‘personal’’, mientras un valor menor de 1.5 indica pobre repetibilidad de algún analista en una serie de mediciones [(8)].

El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados. Así, la USP indica en general una RSD del sistema de no más de 2%, inyectando 5 veces la solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1% e incluso menores [(8)].

Existen tablas que relacionan la RSD máxima aceptable para un método analítico en función de los límites de aceptación y del número de réplicas (ver Tabla 3).

Por ejemplo, para un intervalo de aceptación de 95-105 %, para efectuar una determinación por duplicado, la (Deviación Estándar Relativa) RSD deberá ser menor del 2,7%.

Por otra parte, la magnitud porcentual o la masa relativa del analito y la complejidad de la matriz resulta también de importancia y para el análisis de trazas o para el ensayo de una droga en fluidos biológicos puede no ser precisión indicada, resultando apropiadas RSD de 5 % a 10 % o mayores [(8)].

Tabla 03. Criterios de aceptación para la precisión, cuando se evalúa un método analítico [8]

Límites de Aceptación	Simple		Duplicado	
	%RSD Método	%RSD Sistema	%RSD Método	%RSD Sistema
98,5 – 101,5	0,6	0,4	0,8	0,6
97 – 103	1,2	0,8	1,6	1,2
95 – 105	1,9	1,4	2,7	1,9
93 – 107	2,7	1,9	3,8	2,7
90 – 110	3,9	2,8	5,5	3,9

RSD = Desviación estándar relativa
Fuente: Quattrocchi O. Introducción a la HPLC**.** pág. 317 [8]

Tabla 04. Criterios para evaluar el coeficiente de correlación.

Valores	Descripción
± 0,96 a ± 1,0	Perfecto
± 0,85 a ± 0,95	Fuerte
± 0,70 a ± 0,84	Significativa
± 0,50 a ± 0,69	Moderada
± 0,20 a ± 0,49	Débil
± 0,10 a ± 0,19	Muy débil
± 0,09 a ± 0,0	Nula

Fuente: Tomado de T. Fonseca, L. Salcedo y D. Rocha (2017). [19]

Horwitz ha encontrado una ecuación empírica que relaciona la RSD de un método dado con la concentración de analito en la muestra. Para ello, se recopilaron resultados de unos 150 ensayos Inter laboratorios de la AOAC comprendiendo, por lo menos, 5 metodologías diferentes (cromatografía, absorción atómica, espectrofotometría, bioensayos). La relación hallada es la siguiente: [8]

$$\textbf{RDS (\%)} = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Donde C es la concentración del analito expresada en potenciales de 10.

Así, si la concentración de analito es 1 ppm (10^{-6}), la RSD será:

RDS = 2^4 = 16%

Y si la concentración de analito es 1 ppm (10^{-9}), la RSD será:

RSD = $2^{5.5}$ = 45%

En el mismo trabajo, Horwitz reporto que la RSD entre laboratorios tiende a disminuir al aumentar la experiencia analítica hasta un valor que se aproxima bastante al estimado por cálculo [8].

Límites de Confianza

En muchos casos debe indicarse el intervalo de confianza de la medida, es decir, el rango en el cual puede definirse la probabilidad de que este "capture" con la probabilidad indicada el parámetro μ [8].

Los criterios pueden ser varios, pero deberá dejarse constancia del empleado: la media ± 2 desviaciones estándar (correspondientes al 95% de las medidas en una distribución normal o gaussiana), la media ± 3 desviaciones estándar (99,7%) de las medidas para el mismo tipo de distribución) o preferentemente, cuando el número de muestras es pequeño (menor de 30), las medidas independientes, y la distribución normal, puede calcularse de acuerdo a la distribución de t de Student según: [8]

$$\overline{X} - \frac{t_{\nu,\alpha}.S}{\sqrt{n}} =< \mu < \overline{X} + \frac{t_{\nu,\alpha}.S}{\sqrt{n}}$$

Donde $t_{\upsilon,\alpha}$ es el valor ''t de Student'', tabulado para n mediciones con $\upsilon = n-1$ grados de libertad y para varios niveles α, de significación (el nivel más empleado es p: 0.05, correspondiente a un intervalo de confianza del 95%) [8].

- **Exactitud**

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, correspondiente a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Matemáticamente, suele expresarse de los siguientes modos [8].

Desviación: $B = \overline{X} - \hat{X}$

Desviación Relativa: $B\% = \frac{B}{\overline{X}} \cdot 100$

Recuperación: $R = \frac{\overline{X}}{\hat{X}} \cdot 100$

Donde $\overline{X}$ es el valor medio y $\hat{X}$ el valor verdadero.

De todas estas expresiones la más utilizada es la recuperación [8].

- **Sensibilidad**

La sensibilidad del método analítico está dada por la cantidad de analito que puede ser significativo, pudiendo reconocerse dos tipos de sensibilidad [8]:

a. **Sensibilidad de calibración:** Correspondiente a la pendiente de la curva de calibración [8].
b. **Sensibilidad analítica:** Correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida [8].

Resulta claro que dos técnicas o la misma técnica empleada para diferentes matrices, pueden tener la misma sensibilidad de calibración, pero diferente sensibilidad analítica debida a factores propios como necesidad de extracción, concentración, etc. [8].

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación [8].

- **Límite de detección:** Corresponde, según la USP XXII, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (%, ppm, ppb, etc). Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando supere la relación señal /ruido en un factor de 2 ó 3 (según criterio del analista) [8].
- **Límite de cuantificación:** corresponde, según la misma referencia, a la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración. El detector registra la señal de fondo (relación señal/ruido); realizando varias mediciones sobre un blanco o un placebo, luego se determina la desviación estándar y se deduce el límite de cuantificación a partir de la desviación estándar por un factor, que por lo generalmente es 10. Luego el valor obtenido se valida mediante el análisis de un numero variable de muestras de concentración próxima al límite fijado [8].

Estos límites de detección y cuantificación son importantes y determinante su cuantificación cuando se requiere detectar impurezas o trazas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección. De lo contrario basta con la determinación de la precisión y exactitud con la menor concentración más probable para el analito [8].

Los límites de detección y cuantificación también pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero [8]:

1. Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: **b** [13].
2. Por otro lado, se prepara otra curva de calibración, con tres repeticiones, pero para concentraciones menores de analito, luego se determina la ecuación de la nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, así se tiene un estimado de la respuesta del blanco: $\mathbf{Y_{bl}}$ [8].
3. Se calcula la desviación estándar para a cada concentración del punto 2, se determina la respectiva recta de la concentración vs S y, extrapolandose como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, para así obtener el estimado $\mathbf{S_{bl}}$, de la desviación estándar del blanco [8].

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n' medidas individuales como:

$$\textbf{Limite de detección} = \frac{Y_{bl}\ 3\ s_{bl}}{b}\frac{1}{\sqrt{n'}}$$

$$\textbf{Limite de cuantificación} = \frac{Y_{bl}\ 10\ s_{bl}}{b}\frac{1}{\sqrt{n'}}$$

1.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS [14]

Según Unión Internacional de química Pura y aplicada (IUPAC) en todos los tipos de cromatografía se utilizan los siguientes términos por igual.

- **Cromatografía:** Es un método físico que permite separar a los componentes de una mezcla distribuido entre las dos fases: estacionaria (fase estacionaria) y fase móvil, la que se mueve en una determinada dirección.
- **Cromatograma:** Es una representación gráfica dada por el detector, y corresponde a la medida del analito en el efluente o de otra magnitud utilizada para medir una propiedad del efluente frente al volumen de efluente o tiempo. En cromatografía en plano, "el cromatograma" corresponde al papel o las capa separadas en zonas.
- **Cromatografiar:** Separar por cromatografía.
- **Cromatógrafo:** Sistema instrumental para llevar a cabo la separación cromatográfica.
- **Fase estacionaria:** La fase estacionaria es una de las dos fases que forman un sistema cromatográfico. Puede ser un sólido, un gel, o un líquido. Si es un líquido, puede estar adherido sobre un sólido. Este sólido puede o no contribuir al proceso de separación. El líquido también se puede unir químicamente al sólido (*fase unida químicamente)* o inmovilizarse sobre él (*fase inmovilizada*).
- **Fase unida químicamente:** La fase estacionaria está fuertemente unida por enlaces covalentes a las partículas del soporte o a la pared interna de la columna. La fase inmovilizada o fase estacionaria soportada a la pared interna de la columna o a partículas fijas como es el caso de polimerización *in situ* (reticulación) después del recubrimiento.
- **Fase móvil:** Corresponde al fluido, si este es gas corresponde a la *cromatografía de gases*; si es liquido se denomina *cromatografía liquida* o si es un fluido supercrítico a la *cromatografía de fluidos supercríticos.* Este fluido viaja a lo largo de la fase estacionaria en forma unidireccional. En cromatografía de gases se puede utilizar la expresión *gas portador* para designar la fase móvil, y en cromatografía de elución se puede utilizar la palabra *eluyente* para designar esta misma fase.
- **Eluir:** Cromatografiar por cromatografía de elución. Este proceso de elución puede pararse mientras todos los componentes de la mezcla están todavía en el lecho

cromatográfico, o bien puede continuar hasta que todos los componentes lo hayan abandonado.

- **Efluente:** Es la fase móvil que sale de la columna.
- **Muestra:** La muestra consiste en un determinado número de componentes cuya separación se alcanza en el lecho cromatográfico cuando son arrastrados o eluídos por la fase móvil.
- **Componentes de la muestra:** Son los constituyentes químicamente puros de la muestra. Pueden no ser retenidos por la fase estacionaria, estar parcialmente retenidos (es decir eluídos en tiempos diferentes), o bien permanentemente retenidos.
- **Soluto:** Es un término que designa a los componentes de una muestra en una cromatografía de reparto.
- **Disolvente:** Es un término con el que algunas veces se denomina a la fase estacionaria
  líquida, en una cromatografía de reparto.
- **Zona:** Es una región del lecho cromatográfico donde se localizan uno o más componentes de la muestra. Se puede utilizar también el término *banda*.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. FORMULACIÓN DE HIPOTESIS

Hi: El método analítico por cromatografía liquida de alta performance - HPLC propuesto es válido para cuantificar curcuminoides en palillo comercial.

2.2. VARIABLES Y SU OPERACIONALIZACIÓN

2.2.1. Variable independiente

Curcuminoides

Indicadores: Bisdetoxicurcumina, detoxicurcumina, curcumina

Índice: ppm (mg/L)

2.2.2. Variable dependiente

Validación del método analítico

Indicadores: Linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad

Índices:

Linealidad: r, r^2, t student

Precisión: repetibilidad y reproducibilidad

Exactitud: % de recuperación promedio, t student

Sensibilidad: Limite de detección y límite de cuantificación

2.2.3. **Operacionalización de variables** (Anexo 1)

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1. TIPO Y DISEÑO

La investigación es de tipo analítico, diseño experimental y prospectivo. El estudio se realizó en la en la ciudad de Arequipa, en la Universidad Católica de Santa María – Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Biotecnológicas – Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, acreditado por el INACAL (Instituto Nacional de Calidad) de acuerdo con la norma ISO 17025.

3.2. DISEÑO MUESTRAL

La población correspondió a los puestos de los mercados de: *Mercado de Belén* (Muestra A), *Mercado Modelo de Punchana* (Muestra B), *Mercado de Trujillo* (Muestra C) y *Mercado de Masusa* (Muestra D), que comercializan condimentos.

La muestra estuvo representada por cuatro puestos que comercializaban palillo comercial (*Curcuma longa* L.), se seleccionó un puesto por cada uno de los cuatro mercados de la ciudad de Iquitos considerados como población.

El diseño muestral fue por conveniencia ya que no se aleatorizaron los puestos a muestrear. Se adquirió aproximadamente 250 g (las vendedoras no cuentan con balanza, su medida es por cucharaditas)

3.3. PROCEDIMIENTOS Y RECOLECCIÓN DE DATOS

Determinación de los parámetros para la validación de un método analítico de HPLC, tomado en cuenta los parámetros analíticos, las características de desempeño de un proceso en base a lo desarrollado por Yulig Long [(1)], al cual se le han realizado la adaptación.

3.3.1. Preparación de la muestra estándar y la curva de calibración

Se preparó el estándar de curcumina (marca. Merck) a 25 mg de muestra, enrazado en 25 mL de metanol (25 mg/25 mL, que equivale a 1000 ppm).

Se llevó al baño de ultrasonido por 30 minutos y se esperó a que se enfríen las muestras.

Luego se prepararon los puntos de concentración a 50 ppm (0.5 mL), 80 ppm (0.8 mL), 140 ppm (1.4 mL), 260 ppm (2,6 mL) y 500 ppm (5 mL) enrazados en unas fiola ámbar de 10 mL respectivamente. Para la lectura en HPLC, se procedió a colocar en viales ámbar para su respectivo análisis. Los análisis se llevaron a cabo en la Universidad

Católica de Santa María – Laboratorio de Ensayos y Control de Calidad, ubicado en la ciudad de Arequipa – Perú.

Los equipos están calibrados, ya que es un laboratorio de ensayos y control de calidad acreditada por el INACAL (Instituto Nacional de Calidad) de acuerdo con la norma ISO 17025.

3.3.2. Preparación de las muestras de palillos

Para la preparación de la fase móvil, se empleó los siguientes solventes: Agua Ultra Pura, ácido acético 2% y acetonitrilo.

- **Preparación del ácido acético al 2%**

Con la ayuda de una pipeta de 10 mL y una perilla de goma, se extrajo 20 mL de ácido glacial y se añadió 1 L de Agua Ultra Pura. Filtramos la solución con la ayuda de una Bomba de Vacío de Alto Rendimiento Millipone, Volker de 50 mL y filtro de Membrana de Nylon de 0,2 μm. Una vez filtrado la solución, lo depositamos en un frasco con tapa rosca de 500 mL, para luego ser llevados al HPLC.

- **Preparación del acetonitrilo**

Se midió 500 mL del solvente acetonitrilo, filtramos el solvente como en el procedimiento anterior, llevamos el solvente filtrado en un frasco con tapa rosca de 500 mL, para ser usado durante el proceso de análisis.

- **Preparación del Agua Ultra Pura 18,2 MΩ.cm 27,2 °C**

Tomamos 500 mL de Agua Ultra Pura del Purificador de Agua Tipo I PU RELNS CLASSIC UV ELGN, filtramos el solvente como en el proceso anterior, llevamos el solvente filtrado en un frasco con tapa rosca de 500 mL, finalmente es llevado al equipo de HPLC.

Se pesó en una balanza analítica (marca: KERN) 25 mg de cada una de las 4 muestras (Muestra A, Muestra B, Muestra C, Muestra D), del palillo comercial (*Curcuma longa L.*), en una fiola ámbar de 25 mL y se enrazó con metanol. (Muestra Stock)

Peso de las muestras:

Muestra A: 25,1 mg;	Muestra B: 25,0 mg
Muestra C: 25,0 mg;	Muestra D: 25,0 mg

Una vez pesado y enrazado, se procedió a llevar al baño de ultrasonido por 30 minutos y se esperó a que enfríen las muestras.

Una vez terminado el proceso del baño de ultrasonido, dejamos que repose hasta que se enfríen las muestras en un lapso de 5 min a 10 min.

Con la ayuda de jeringas de 10 mL y un filtro de membrana, se depositó en los viales de color ámbar, para ser llevados a sus respectivos análisis en el HPLC, durante 2 horas.

3.3.3. Preparación para la lectura en el HPLC

Se colocó los viales al equipo de HPLC en **fase normal** usando un detector UV con una detección a 425 nm, para su lectura y sus corridas.

Los puntos de lectura fueron para las concentraciones teóricas de 50 ppm, 80 ppm, 140 ppm, 260 ppm y 500 ppm.

Se procesaron cuatro (4) muestras y se evaluó la **repetitividad** por triplicado, con diez (10) lecturas para cada repetición.

Los resultados, representados en una gráfica, permitió la comparación de las curvas de las 4 muestras (A, B, C, D), para poder elegir cuál de ellas presenta una curva de concentraciones más acordes con la curva de calibración del estándar.

Las muestras “A”, “B” y “C” al momento de su disolución en el indicador, dejaron ver que estaban contaminadas con tierra, eso se corroboró por su baja concentración que se puede ver en los cromatogramas (Anexo 7. a, b y c) esto por las condiciones en que se expenden los aliños en los mercados, con muy poco o nulo control de calidad por lo que contienen contaminantes e impurezas. Por lo que se tomó como referencia la muestra “D”, que se disolvió visiblemente en su totalidad y de acuerdo con el resultado del HPLC en la curva de calibración con el estándar se decidió tomar el punto medio de la curva de la muestra que es 140 ppm (1,4 mL).

Luego se empezó a realizar la repetitividad del punto medio, de las concentraciones de los diferentes metabolitos, programando al equipo para que lea la muestra con 10 lecturas en unas 2 horas, a fin de analizar los metabolitos presentes que conlleven a la validación del método.

Para el desarrollo del método se utilizó un cromatógrafo líquido, Modelo: VWR HITACHI, Organizar: ELITE LAChom, Autosampler: Autosamper L-2200, Columna: Oven L-2350, N° Columna: 1.50943.0001 LiChrospher R 100 RP-18 (5um). Se utilizo el software Chromaster para recolectar todos los datos obtenidos durante el proceso de investigación.

Los equipos están calibrados, ya que es un laboratorio de ensayos y control de calidad acreditada con norma ISO 17025.

3.4. ASPECTO ÉTICOS

Con la presente investigación no se quitó la vida a la especie con la que se trabajó, especie que luego de la poda, vuelve a retoñar debido a su fácil capacidad de regeneración.

No se hicieron pruebas de principio activo aislado con animales ni humanos.

El trabajo estuvo exento de peligros de contaminación ambiental ya que los restos de reactivos fueron adecuadamente eliminados como corresponde a su naturaleza.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

1. LINEALIDAD

Para determinar la linealidad del sistema se realizaron mediciones del área del pico del palillo comercial a diferentes concentraciones (5,6040; 8,9664; 15,6912; 29,1408 y 56,0400 ppm) y se analizaron por triplicado con un solo estándar de la misma concentración, los resultados obtenidos de las áreas correspondientes a las concentraciones se muestran en la Tabla N° 5.

Tabla 05. Concentraciones teóricas y prácticas del estándar de bisdetoxicurcumina determinadas por HPLC.

Conc. Teórica (ppm)	Conc. Practica (ppm)	Áreas			Promedio (Áreas)	S	RSD (%)
		Repet, 01	Repet. 02	Repet. 03			
50	5,604	582706	700671	677251	653542,6667	62453,9759	9,56
80	8,9664	1387133	1345527	1413330	1381996,667	34192,0772	2,47
140	15,6912	2942963	3312544	3299290	3184932,333	209656,352	6,58
260	29,1408	7237704	7123750	7538703	7300052,333	214387,462	2,94
500	56,04	16422996	16737988	16878564	16679849,33	233282,295	1,40

De acuerdo a la tabla 5, el área del pico se incrementa a medida que se miden mayores concentraciones del estándar de bisdetoxicurcumina, demostrando que el método analítico permite establecer concordancia entre las concentraciones y las áreas.

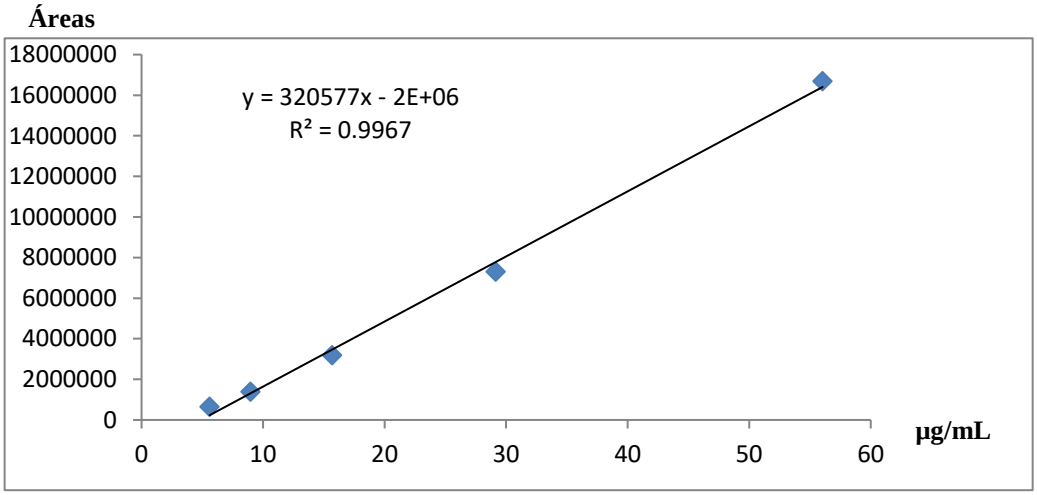


Figura 10. Representación gráfica de la linealidad de la bisdetoxicurcumina.

De acuerdo con la figura 10, se representan los puntos de dispersión que relacionan las diferentes concentraciones finales y el valor promedio del área de las mismas. Luego haciendo uso de la estadística de regresión lineal se halló el coeficiente de determinación (r^2) igual a 0,9967 (el mismo que no debe ser menor de 0,99 para ser

aceptado); para una pendiente (b) la variable Y cambia a razón de 320577 por cada unidad de X, un intercepto (α) de 2 x10^6. El coeficiente de correlación lineal (r) de 0,9984, indica un grado de intensidad de una relación lineal perfecta positiva (± 0,96 y ± 1,0) entre la concentración (variable independiente) y el área del pico (variable dependiente).

Tabla 06. Determinación de los parámetros de linealidad del sistema para la validación del método de determinación de la bisdetoxicurcumina.

Linealidad del sistema	Valor obtenido
Coeficiente de correlación múltiple (r)	0,998362853
Coeficiente de determinación r^2	0,996728385
r^2 ajustado	0,995637847
Error típico (error estándar)	434926,4931
Observaciones	5

Tabla 07. Análisis de varianza con la prueba F para la bisdetoxicurcumina.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1,7289E+14	1,7289E+14	913,9784163	7,94985E-05
Residuos	3	5,6748E+11	1,8916E+11		
Total	4	1,7346E+14			

De acuerdo la tabla 7, se muestra la prueba F para varianza de medias de 2 muestras independientes, similares y con distribución normal; donde el valor crítico de F que es menor al α = 0,05; muestra que existe una relación estadísticamente significativa con una alta correlación entre concentración y áreas con un IC 95%.

Tabla 08. Análisis de varianza con la prueba de t de la Bisdetoxicurcumina.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
a Intercepción (Variable Y)	-1561571,723	312686,3624	-4,994051264	0,015442745
b cc (Variable X)	320577,465	10603.88528	30,23207595	7.94985E-05

De acuerdo a la tabla 6 y 8, en la determinación del parámetro de linealidad de una correlación significativa entre “x”, “y” se aplicó el contraste estadístico en el coeficiente de correlación donde se calcula el valor $t_{regresión}$ (de acuerdo a fórmula) con n-2 de libertad a un intervalo de confianza del 95% y fue de 30,23. Resultado que indica la existencia de una influencia significativa de los coeficientes ya que el p-valor es igual a 0,015 (debe ser p-valor <0,05).

Tabla 09. Presenta el intervalo de confianza del error estándar de la Bisdetoxicurcumina.

	Inferior 95%	Superior 95%
a Intercepción (Variable Y)	-2556679,282	-566464,1647
b cc (Variable X)	286831,1695	354323,7606

De acuerdo con la tabla 9, se tienen los límites inferior y superior, con una confianza de 95%; eso quiere decir que cada vez que alguien replique este estudio en una muestra del mismo tamaño, obtenidas de la misma forma que el valor medio estará entre estos límites.

Tabla 10. Concentraciones teóricas y prácticas del estándar de detoxicurcumina determinadas por HPLC.

Conc. Teórica (ppm)	Conc. Practica (ppm)	Áreas			Promedio (Áreas)	S	RSD (%)
		Repet. 01	Repet. 02	Repet. 03			
50	7,174	742471	851024	869012	820835,6667	68459,16865	8,34
80	11,4784	1688730	1814558	1866725	1790004,333	91502,55142	5,11
140	20,0872	4127357	4240321	4259908	4209195,333	71547,51739	1,70
260	37,3018	9656994	9679362	9934596	9756984	154222,5624	1,58
500	71,74	22329842	22764987	22947672	22680833,67	317395,3605	1,40

De acuerdo con la tabla 10, el área del pico se incrementa a medida que se miden mayores concentraciones del estándar de curcumina, demostrando que el método analítico permite establecer concordancia entre las concentraciones y las áreas.

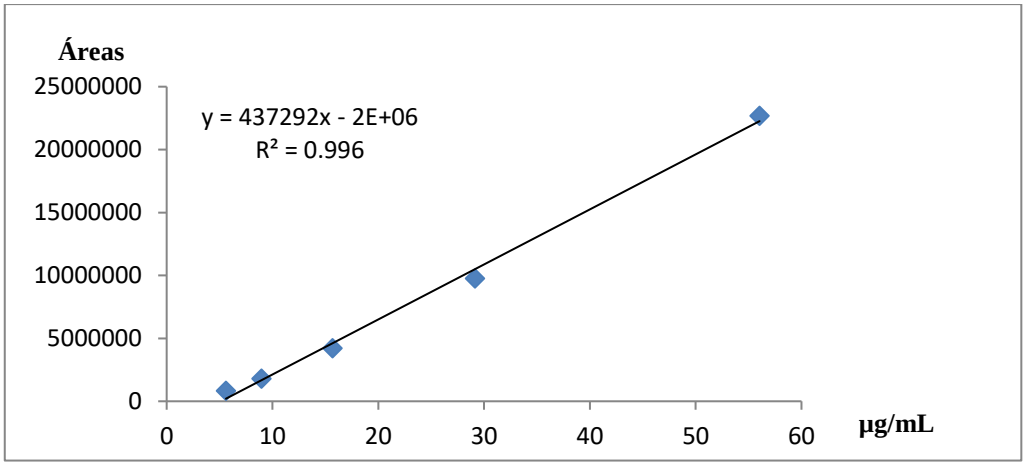


Figura 11. Representación gráfica de la linealidad de la detoxicurcumina.

De acuerdo con la figura 11, se representan los puntos de dispersión que relacionan las diferentes concentraciones finales y el valor promedio del área de las mismas. Luego haciendo uso de la estadística de regresión lineal se halló el coeficiente de

determinación (r^2) igual a 0,996 (el mismo que no debe ser menor de 0,99 para ser aceptado); para una pendiente (b) la variable Y cambia a razón de 437292 por cada unidad de X, un intercepto (α) de 2 $x10^6$. El coeficiente de correlación lineal (r) de 0,998, indica un grado de intensidad de una relación lineal perfecta positiva (± 0,96 y ± 1,0) entre la concentración (variable independiente) y el área del pico (variable dependiente).

Tabla 11. Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión de la detoxicurcumina.

Linealidad del sistema	**Valor obtenido**
Coeficiente de correlación múltiple (r)	0,998011655
Coeficiente de determinación r^2	0,996027264
r^2 ajustado	0,994703019
Error típico (error estándar)	653989,7056
Observaciones	5

Tabla 12. Análisis de varianza con la prueba F para la detoxicurcumina.

	Grados de libertad	**Suma de cuadrados**	**Promedio de los cuadrados**	**F**	**Valor crítico de F**
Regresión	1	3,21695E+14	3,21695E+14	752,147173	0,0001064
Residuos	3	1,28311E+12	4,27703E+11		
Total	4	3,22978E+14			

De acuerdo con la tabla 12, que muestra la prueba F para varianza de medias de 2 muestras independientes, similares y con distribución normal; donde el valor crítico de F que es menor al α = 0,05; muestra que existe una relación estadísticamente significativa con una alta correlación entre concentración y áreas con un IC 95%, conservando la linealidad.

Tabla 13. Análisis de varianza con la prueba de t de la detoxicurcumina.

	Coeficientes	**Error típico**	**Estadístico t**	**Probabilidad**
a Intercepción (Variable Y)	-2244835,859	470179,8243	-4,774419792	0,017460064
b cc (Variable X)	437291,9507	15944,83647	27,42530169	0,0001064

De acuerdo con la tabla 11 y 13, en la determinación del parámetro de linealidad de una correlación significativa entre “x”, “y” se aplicó el contraste estadístico en el coeficiente de correlación donde se calcula el valor $t_{regresión}$ (de acuerdo a fórmula) con

n-2 de libertad a un intervalo de confianza del 95% y fue de 27,43. Resultado que indica la existencia de una influencia significativa de los coeficientes ya que el p-valor es igual a 0,017 (es decir el p-valor es <0,05).

Tabla 14. Presenta el intervalo de confianza del error estándar de la detoxicurcumina.

	Inferior 95%	Superior 95%
a Intercepción (Variable Y)	-3741157,904	-748513,8144
b cc (Variable X)	386548,3648	488035,5367

De acuerdo con la tabla 14, se tienen los límites inferior y superior, con una confianza de 95%; eso quiere decir que cada vez que alguien replique este estudio en una muestra del mismo tamaño, obtenidas de la misma forma que el valor medio estará entre estos límites.

Tabla 15. Concentraciones teóricas y prácticas del estándar curcumina determinadas por HPLC.

Conc. Teórica (ppm)	Conc. Practica (ppm)	Áreas			Promedio (Áreas)	S	RSD (%)
		Repet. 01	Repet. 02	Repet. 03			
50	32,222	5022462	5770938	4934767	5242722,333	459544,825	8,77
80	59,5552	10004960	9774190	9886343	9888497,667	115400,0874	1,17
140	104,222	21143863	22001176	21350428	21498489	447423,6692	2,08
260	193	44405560	44346645	45264344	44672183	513671,8133	1,15
500	372,22	93585254	94892021	95108949	94528741,33	824251,6002	0,87

De acuerdo con la tabla 15, el área del pico se incrementa a medida que se miden mayores concentraciones del estándar de bisdetoxicurcumina, demostrando que el método analítico permite establecer concordancia entre las concentraciones y las áreas.

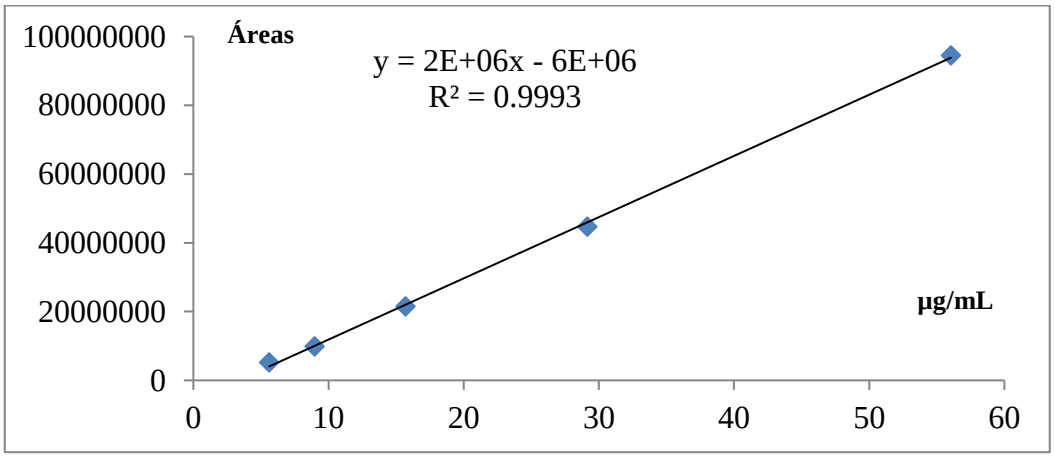


Figura 12. Representación gráfica de la linealidad de la curcumina.

De acuerdo con la figura 12, se representan los puntos de dispersión que relacionan las diferentes concentraciones finales y el valor promedio del área de las mismas. Luego haciendo uso de la estadística de regresión lineal se halló el coeficiente de determinación (r^2) igual a 0,9993 (el mismo que no debe ser menor de 0,99 para ser aceptado); para una pendiente (b) la variable Y cambia a razón de 2 $x10^6$ por cada unidad de X, un intercepto (α) de 2 $x10^6$. El coeficiente de correlación lineal (r) de 0,9996, indica un grado de intensidad de una relación lineal perfecta positiva (± 0,96 y ± 1,0) entre la concentración (variable independiente) y el área del pico (variable dependiente).

Tabla 16. Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión de la curcumina.

Linealidad del sistema	Valor obtenido
Coeficiente de correlación múltiple (r)	0,999642364
Coeficiente de determinación r^2	0,999284855
r^2 ajustado	0,999046473
Error típico (error estándar)	1127774,561
Observaciones	5

Tabla 17. Análisis de varianza con la prueba F de la curcumina.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	5.33164E+15	5.33164E+15	4191.953251	8.11845E-06
Residuos	3	3.81563E+12	1.27188E+12		
Total	4	5.33546E+15			

De acuerdo la tabla 17, que muestra la prueba F para varianza de medias de 2 muestras independientes, similares y con distribución normal; donde el valor crítico de F que es menor al α = 0,05; muestra que existe una relación estadísticamente significativa con una alta correlación entre concentración y áreas con un IC 95%, conservando la linealidad.

Tabla 18. Análisis de varianza con la prueba de t de la curcumina

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
a Intercepción (Variable Y)	-5937014,216	810803,0456	-7,32238766	0,005261328
b cc (Variable X)	1780244,558	27496,12235	64,74529521	8,11845E-06

De acuerdo a la tabla 16 y 18, en la determinación del parámetro de linealidad de una correlación significativa entre “x”, “y” se aplicó el contraste estadístico en el coeficiente de correlación donde se calcula el valor $t_{regresión}$ (de acuerdo a fórmula) con n-2 de libertad a un intervalo de confianza del 95% y fue de 64,75. Resultado que indica la existencia de una influencia significativa de los coeficientes ya que el p-valor es igual a 0,005 (es decir el p-valor es <0,05).

Tabla 19. Presenta el intervalo de confianza del error estándar de la curcumina.

	Inferior 95%	**Superior 95%**
a Intercepción (Variable Y)	-8517351,373	-3356677,059
b cc (Variable X)	1692739,625	1867749,491

De acuerdo a la tabla 19, se tienen los límites inferior y superior, con una confianza de 95%; eso quiere decir que cada vez que alguien replique este estudio en una muestra del mismo tamaño, obtenidas de la misma forma que el valor medio estará entre estos límites

.

2. PRECISIÓN

Tabla 20. Evaluación de la precisión de la concentración práctica frente a la concentración teórica media de Bisdetoxicurcumina disuelta en metanol **(**15,6912 mg/mL).

Lectura	**Concentración Practica**	**Concentración al 100 %**
1	15,8193	100,82
2	15,7926	100,65
3	15,8381	100,94
4	15,8513	101,02
5	16,1929	103,20
6	16,3142	103,97
7	15,4425	98,42
8	15,7574	100,42
9	15,5822	99,31
10	15,4799	98,65
	Promedio	100,74
	S	1,78
	DSR %	1,77

De acuerdo con la tabla 20, se aprecia que la variación de las mediciones de la concentración del analito (dispersión de los valores) presentan un DSR de 1,78% (Límite de aceptación RSD < 2,0%) demostrando que hay repetibilidad del método.

Al aplicar la **ecuación de Horwitz** permitió evaluar el nivel de desempeño en el laboratorio para el analito bisdetoxicurcumina, encontrándose que la concentración del analito era de 15,6912 ppm y un CV de 10,571967%. (Límite de aceptación de CV = 16,0%), resultado que permite aceptar el desempeño en el laboratorio**.**

Tabla 21. Evaluación de la precisión de la concentración práctica frente a la concentración teórica media de detoxicurcumina disuelta en metanol **(**20,0872mg/mL)

Lectura	Concentración Practica	Concentración al 100 %
1	19,5082	97,12
2	19,5554	97,35
3	19,6641	97,89
4	19,9595	99,36
5	20,4236	101,67
6	20,3168	101,14
7	19,5962	97,56
8	20,1684	100,40
9	20,4273	101,69
10	20,1918	100,52
	Promedio	99,47
	S	1,85
	RSD%	1,86

De acuerdo con la tabla 21, se aprecia que la variación de las mediciones de la concentración del analito detoxicurcumina (dispersión de los valores) presentan un DSR de 1,85% (Límite de aceptación RSD < 2,0%) demostrando que hay repetibilidad del método.

Al aplicar la **ecuación de Horwitz** se evaluó el nivel de desempeño en el laboratorio para el analito detoxicurcumina, encontrándose que la concentración del analito era de 20,0872 ppm y un CV de 10,1862% (límite de aceptación de CV = 16,0%), resultado que permite aceptar el desempeño en el laboratorio**.**

Tabla 22. Evaluación de la precisión de la concentración teórica media de curcumina disuelta en metanol **(**104,2216 mg/mL).

Lectura	Concentración Practica	Concentración al 100 %
1	103,7128	99,51
2	103,5926	99,40
3	103,9358	99,73
4	104,4785	100,25
5	103,9655	99,75
6	104,1394	99,92
7	104,4201	100,19
8	103,9807	99,77
9	104,2651	100,04
10	103,9714	99,76
	Promedio	99,83
	S	0,27
	RSD %	0,27

De acuerdo con la tabla 22, se aprecia que la variación de las mediciones de la concentración del analito curcumina (dispersión de los valores) presentan un DSR de 0,27% (Límite de aceptación RSD < 2,0%) demostrando que hay repetibilidad del método.

Luego se aplicó la **ecuación de Horwitz** que permitió evaluar el nivel de desempeño en el laboratorio para el analito bisdetoxicurcumina, encontrándose que la concentración del analito era de 104,2216 ppm y un CV de 7,950365199% (límite de aceptación de CV = 16,0%), resultado que permite aceptar el desempeño en el laboratorio**.**

3. EXACTITUD

Con los datos de la tabla 20, se evaluó la exactitud del método para Bisdetoxicurcumina, para lo cual se realizó la prueba t para medias de dos pruebas emparejadas.

Tabla 23. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas para Bisdetoxicurcumina.

	Practico	Teórico
Media	15,80704	15,6912
Varianza	0,078034316	0
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	1,311341287	
P(T<=t) una cola	0,111104515	
Valor crítico de t (una cola)	1,833112933	
P(T<=t) dos colas	0,222209029	
Valor crítico de t (dos colas)	2,262157163	

De acuerdo a la tabla 20, se aprecia que el DSR es de 1,78% (Límite de aceptación RSD < 2,0%) y de acuerdo a los documentos de la ICH para evaluar la exactitud se debe leer un mínimo de nueve repeticiones (se realizaron 10 lecturas) y para el presente análisis de bisdetoxicurcumina el porcentaje de recuperación fue de 98,65% y el mayor 103,97% (para considerar el método como exacto (no debe ser menor al 98% ni mayor a 102%).

De la tabla 23 se tiene que, la prueba estadística de t de student, indica que el p > 0,05, confirma que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico, por lo que se puede afirmar que el método analítico propuesto es exacto.

Tabla 24. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas para Detoxicurcumina.

	Practico	Teórico
Media	19,98113	20,0872
Varianza	0,137892158	0
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-0,903280812	
P(T<=t) una cola	0,194956496	
Valor crítico de t (una cola)	1,833112933	
P(T<=t) dos colas	0,389912992	
Valor crítico de t (dos colas)	2,262157163	

De acuerdo a la tabla 21, se aprecia que el DSR es de 1,86% (Límite de aceptación RSD < 2,0%) y de acuerdo a los documentos de la ICH para evaluar la exactitud se debe leer un mínimo de nueve repeticiones (se realizaron 10 lecturas) y para el presente análisis de detoxicurcumina el porcentaje de recuperación fue de 97,12% y el mayor 101,69% (para considerar el método como exacto (no debe ser menor al 98% ni mayor a 102%).

De la tabla 24 se tiene que, la prueba estadística de t de student, indica que el p > 0.05, confirma que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico.

Tabla 25. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas para Curcumina.

	Practico	**Teórico**
Media	104,04619	104,2216
Varianza	0,080975823	0
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-1,949290933	
P(T<=t) una cola	0,041530623	
Valor crítico de t (una cola)	1,833112933	
P(T<=t) dos colas	0,083061245	
Valor crítico de t (dos colas)	2,262157163	

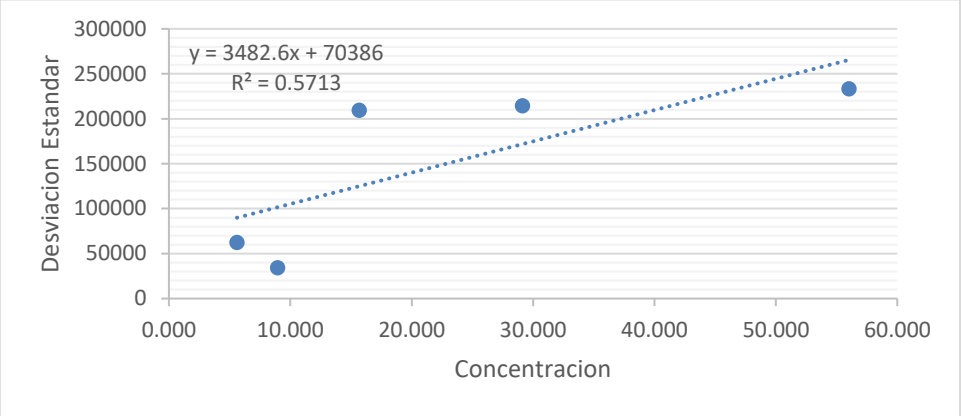
De acuerdo a la tabla 22, se aprecia que el DSR es de 0,27% (Límite de aceptación RSD < 2,0%) y de acuerdo a los documentos de la ICH para evaluar la exactitud se debe leer un mínimo de nueve repeticiones (se realizaron 10 lecturas) y para el presente análisis de detoxicurcumina el porcentaje de recuperación fue de 99,40% y el mayor 100,25% (para considerar el método como exacto (no debe ser menor al 98% ni mayor a 102%).

De la tabla 25 se tiene que, la prueba estadística t de student, indica que el p > 0,05, confirma que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico, por lo que se puede afirmar que el método analítico propuesto es exacto.

4. SENSIBILIDAD

A. BISDETOXICURCUMINA

Figura 13. Representación gráfica de la concentración vs desviación estándar de Bisdetoxicurcumina.



Con los datos de la Tabla 5, se obtuvo la curva de calibración (concentraciones vs áreas promedio) (Figura 10) y la gráfica de la concentración vs desviación estándar (Figura 13), con estos datos se procedió al cálculo del límite de detección y de cuantificación para bisdetoxicurcumina.

Tabla 26. Se presentan los límites de cuantificación y detección para bisdetoxicurcumina.

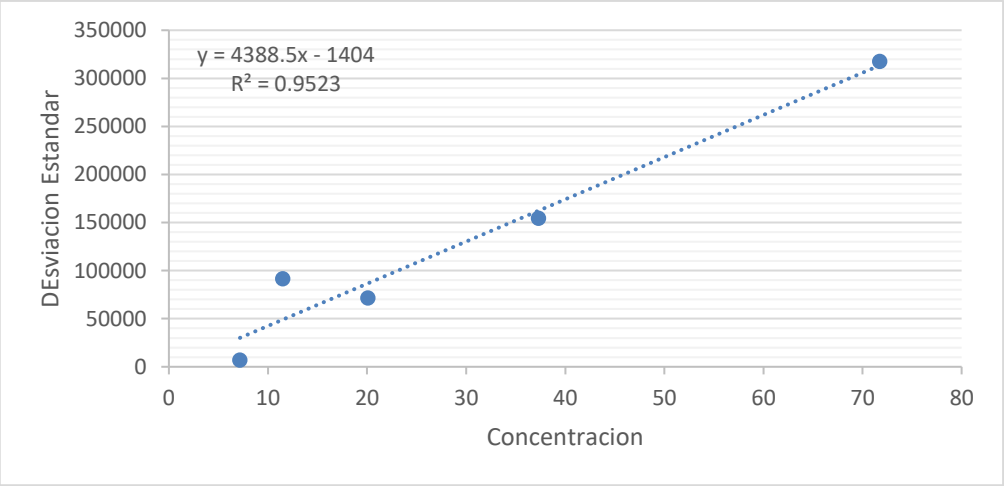
Sensibilidad	y = ax-b según s	
As	70385,5558	
Bs	3482,64055	
Ybl	320577,465	
Desviación estándar del blanco (sbl)	3482,64055	
Límite de Detección	1,03259094	mg/mL
Límite de cuantificación	1,10863647	mg/mL

De la tabla 26 se pudo conocer que los límites de detección del instrumento que indican la concentración mínima del analito bisdetoxicurcumina detectable y el límite de cuantificación del instrumento indica la cantidad más pequeña del analito

bisdetoxicurcumina que pueda ser cuantificado con una sensibilidad confiablemente moderada.

B. DETOXICURCUMINA

Figura 14. Representación gráfica de la concentración vs desviación estándar de Detoxicurcumina.



Con los datos de la Tabla 10, se obtuvo la curva de calibración (concentraciones vs áreas promedio) (Figura 11) y la gráfica de la concentración vs desviación estándar (Figura 14), con estos datos se procedió al cálculo del límite de detección y de cuantificación para detoxicurcumina.

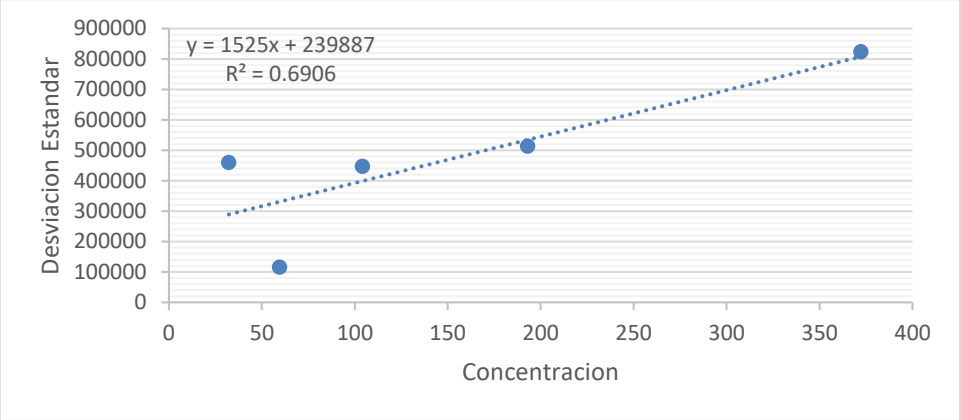
Tabla 27. Se presentan los límites de cuantificación y detección para detoxicurcumina.

Sensibilidad	y = ax-b según s	
As	25702,3416	
Bs	4977,50785	
Ybl	437291.951	
Desviación estándar del blanco (sbl)	4977,50785	
Límite de Detección	1;03414772	mg/mL
Límite de cuantificación	1,11382574	mg/mL

De la tabla 27 se pudo conocer que, los límites de detección del instrumento que indican la concentración mínima del analito detoxicurcumina detectable y el límite de cuantificación del instrumento indica la cantidad más pequeña del analito detoxicurcumina que pueda ser cuantificado como con una sensibilidad confiablemente fuerte.

C. CURCUMINA

Figura 15. Representación gráfica de la concentración vs desviación estándar de Curcumina.



Con los datos de la Tabla 15, se obtuvo la curva de calibración (concentraciones vs áreas promedio) (Figura 12) y la gráfica de la concentración vs desviación estándar (Figura 15), con estos datos se procedió al cálculo del límite de detección y de cuantificación para detoxicurcumina.

Tabla 28. Se presentan los límites de cuantificación y detección para curcumina.

Sensibilidad	y = ax-b según s	
As	234695,572	
Bs	10280,574	
Ybl	1780244,56	
Desviación estándar del blanco (sbl)	10280,574	
Límite de Detección	1,01732443	mg/mL
Límite de cuantificación	1,0577481	mg/mL

De la tabla 28 se pudo conocer que, los límites de detección del instrumento que indican la concentración mínima del analito curcumina detectable pero no necesariamente cuantificada y el límite de cuantificación del instrumento indica la cantidad más pequeña del analito curcumina que pueda ser cuantificado con una sensibilidad confiablemente moderado.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Para evaluar la aptitud del sistema, el criterio del coeficiente de variación no fue suficiente para su validación la bisdetoxicurcumina excepto la última concentración supera el 2% permitido, para el caso de la detoxicurcumina las dos primeras concentraciones también lo superan y para la curcumina solo lo supera la concentración más baja; es decir de quince determinaciones la mitad más uno no permite valida la aptitud del sistema dado que se tuvieron tres repeticiones por concentración y se requiere cinco repeticiones para mejor evaluación de este parámetro, que es fundamental al momento de validar procedimientos. la prueba estadística t de student, indica que el $p > 0,05$, confirma que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico.

Para el parámetro de **linealidad** del método, la representación gráfica de la recta de regresión de los valores experimentales en un sistema de coordenadas permite visualizar la tolerancia ajustada, como se aprecia en la figura 1, 2 y 3; el coeficiente de correlación ($r \geq 0,995$) y el coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0,99$) calculados para los tres analitos, son dos criterios que validad la linealidad del sistema. Estos valores son muy cercanos a los reportados para la linealidad del método por Guardia *et al*. (2014) [(4)], que presentó un Coeficiente de correlación ($r > 0,997$) y Coeficiente de determinación ($r^2 > 0,995$).

El coeficiente de variación el t calculado tuvo una influencia significativa de los coeficientes ya que se cumple que el p-valor sea $<0,05$; así como el test de proporcionalidad del intercepto y la prueba de la linealidad de la pendiente para el t experimental. Por lo que, la estadística de regresión expresa matemáticamente la linealidad del comportamiento analítico para el presente caso e indica la diferencia en el sesgo promedio en todo el rango esperado de operación del sistema de medición.

Para el parámetro de **la precisión** el coeficiente de variación (o RSD) encontrado para los analitos, se demostró que hay repetibilidad y precisión intermedia en su mayoría de las mediciones excepto para la bisdetoxicurcumina que solo es $\leq 2,0$ para la última concentración. La ecuación de Horwitz, parámetro empírico de evaluación en ensayos de aptitud Inter-laboratorios está relacionado con la concentración independientemente de la naturaleza de la muestra e indica de acuerdo con el límite de aceptación (CV=16%) homogeneidad de las muestras. Estos resultados fueron

concordantes con los reportado por Guardia *et al*. (2014) [4]**,** donde la repetibilidad del método fue RSD ≤ 2%.

El parámetro de la **exactitud** en su mayoría el porcentaje de recuperación dio entre 98 a 102% y el Test de recuperación media para p = 0,05; y n – 1 grados de libertad dio un t experimental que indica que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico; por lo que se puede afirmar que el método analítico propuesto es exacto. Estos resultados comparados con los reportados por Guardia *et al*. (2014) [4], quien encontró para la exactitud, un porcentaje de recuperación de 97% a 103% y el Test de T de Student donde el T exp < T tablas fue (0,7830 < 2,160).

El parámetro de la **sensibilidad** analítica que evalúa la variación de la magnitud medida, en función de la respuesta del equipo con que se efectúa la medición; fue validado por el cumplimiento del límite de detección, que es importante en caso de presencia de impurezas y del límite de cuantificación [8]. Para el caso de Bisdetoxicurcumina el método muestra una sensibilidad moderada (R^2 = 0,5713), en el caso de la Detoxicurcumina la sensibilidad es muy alta (R^2 = 0,951) y en el caso de la Cúrcuma el método muestra una sensibilidad alta (R^2 = 0,7007) [3], [4].

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

La lectura de tres repeticiones con diez lecturas de cada una permitió validar la metodología analítica para la determinación de los curcuminoides más representativos del palillo (bisdetoxicurcumina, detoxicurcumina y curcumina), comercializado en polvo como condimento.

De las cuatro muestras de palillo comercial trabajadas a la concentración (25 mg/25mL) por el contenido de impurezas en las muestras “A”, “B” y “C” al tratarse de muestras comercializadas en condiciones inadecuadas, es que se eligió trabajar con la muestra “D” (*Mercado de Masusa*) una dilución de 1,4 mL en 10 mL de metanol se identificó tres curcuminoides: bisdetoxicurcumina, detoxicurcumina y curcumina.

Los parámetros evaluados de linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad con el apoyo de la estadística permitieron determinar que el método analítico de HPLC aplicado, cumple con los parámetros de desempeño, lo que permite su aplicación confiable en análisis de control de calidad.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Es conveniente determinar el factor de asimetría y el número de platos teóricos, para la eficiencia de la columna, realizar diez lecturas.

Es recomendable realizar el ensayo de estabilidad de muestra preparada para mejor evaluación del porcentaje (%) de recuperación de la muestra preparada y para calcular el sesgo de estabilidad de la muestra.

Es conveniente determinar la precisión intermedia no considerado en el presente trabajo operativo de validación tomando como criterio diferentes días de realizar los análisis y realizarlo en diferentes equipos y con diferentes analistas.

CAPÍTULO VII: FUENTES DE INFORMACION

1. Yuling Long, Wenpeng Zhang, Fang Wang, Zilin Chen. Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma longa L*. by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. JPA. (2014); 4(5): 325 – 330. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177913001093

2. Joseline Iveth Funes, Meidy Nairoby Meza, Henry Daniel Ponce. Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de atorvastatina en tabletas mediante HPLC-DAD. Revista portal de la Ciencia. (2015); DOI: 10.5377/pc.v9i0.2670. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/304002245_Desarrollo_y_validacion_de_un_metodo_para_la_cuantificacion_de_atorvastatina_en_tabletas_mediante_HPLC-DA

3. Juana Elizabeth Palomino Cruz. Validación de un Método Analítico para la Valoración de Clorhidrato de Terbinafina en gel 1% por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.). Lima, Perú: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; (2017). 111 p. Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/1695/TESIS%20-%20JUANA%20ELIZABETH%20PALOMINO%20CRUZ.pdf?sequence=2

4. Ruddy Veronica Guardia Vargas, Susan Lizeth Elias Da Silva. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de permetrina 1% en shampoo mediante cromatografía liquida de alta resolución (HPLC). Iquitos, Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. (2014). 130 p. Disponible en: http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4257/Ruddy_Tesis_Titul_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y

5. J. González-Albadalejo, Dionisia Sanz, Rosa M. Claramunt, José Luis Lavandera, Ibon Alkorta, José Elguero. Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biologica properties. (2015); 81 (4): 278-310. Disponible en: https://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1665/1706

6. Quiroga, Analía; Soria, Elio; Quiroga, Patricia; Martínez, Estefanía; Valentich, Mirta A,. EFECTO DE CURCUMINA EN CÈLULAS DE MAMA HUMANA. ZR-75-. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y

Aromáticas, vol. 6, núm. 6, 2007, pp. 358-359. Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.

7. Freire-González, Rosa A.; Vistel-Vigo, Marlén. Caracterización fitoquímica de la *Curcuma longa* L,. Revista Cubana de Química, vol. 27, núm. 1, enero-abril, 2015, pp. 9-18. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

8. Oscar Alberto Quattrocchi, Sara Abelaira de Andrizzi, Raul Felipe Laba. Análisis Cuantitativo. En: Oscar Alberto Quattrocchi. Introducción a la HPLC – Aplicación y Práctica. 1ra Edición. California 2750/52, (1289) Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A; 1992.

9. Jose Alonso Guzman Monje. Validación de un Método de Cuantificación por HPLC de Esteviosido y Rebaudiosido A, Para la optimización de una Metodología de Extracción y Selección de plantas de Estevia (Steviarebaudiana) [dissertation]. Arequipa, Perú: Universidad Católica de Santa María; 2012. 105 p.

10. Aguilar G, Alcántara A, Chárvel A, García JL, Garzón A, Guerrero ME. Validación de métodos analíticos. Mexico: Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos. México AC, 1992. Disponible en: http://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico

11. United States Pharmacopoeial Convention. USP XXII. United States Pharmacopoeia. 22 ed. Easton: Mark Printing; 1990:1225. 1710.

12. Karen Sindy Portales Quezada, Milagros Jesús Sánchez Rodríguez. Validación de una Metodología para determinar Rebaudiosido A por Cromatografía Liquida de Alta Resolución HPLC de la Planta de Stevia Rebaudiana Bertoni. Trujillo, Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2012. 77 p. Disponible en: http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3431/PortalesQuezada_K%20-%20SanchezRodriguez_M.pdf?sequence=1&isAllowed=y

13. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Yale. Nomenclatura para Cromatografía. New Haven, CT 06520, USA: IUPAC y © GCTA (RSEQ); 1993 - 1995. Disponible en:

//www.secyta.es/sites/default/files/docs/books/Libro_Completo_Nomenclatura.pdf

14. Paula Saiz de Cos. Cúrcuma I (Curcuma longa L.). Reduca (Biología) SerieBotánica. 2014; 7(2): 84 – 99

15. Haston, E.; Richardson, J. E.; Stevens, P. F.; Chase, M. W. y Harris, D. J. 2009. The LinearAngiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APGIII. Botanical Journal of the Linnean Society, 161: 128–131

16. Sistema lineal basado en Haston et all (2009). Disponible en: https://eprints.ucm.es/27836/1/C%C3%9ARCUMA%20%20Paula%20Saiz.pdf

17. National Nutrient Database for Standard Reference. Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Mean-nutrient-composition-of-regular-beer-data-from-USDA-National-Nutrient-Database-for_tbl1_299576450

18. Síntesis de curcumina por la ruta de biosíntesis de estilbenoides, derivado de la ruta del Shikimato /Acetato-malonato. Disponible en: https://eprints.ucm.es/27836/1/C%C3%9ARCUMA%20%20Paula%20Saiz.pdf

19. Tomado de T. Fonseca, L. Salcedo y D. Rocha (2017). Disponible en: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.revistaespacios.com%2Fa18v39n10%2F18391009.html&psig=AOvVaw1Ove7gmfInvk_bB2eb1gvi&ust=1594648594198000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCIioso_vx-oCFQAAAAAdAAAAABAD

Anexo 1

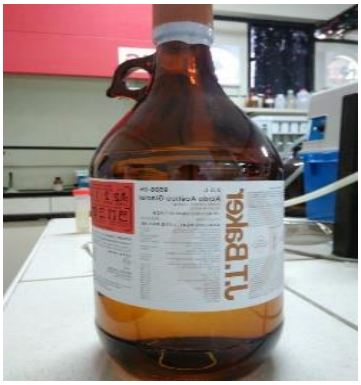
. Operacionalización de variables.

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ÍNDICES	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
CUANTIFICAR CURCUMINOIDES	La cuantificación de Curcuminoides es la obtención de la concentración de analito en la muestra y se realiza por Cromatografía Liquida de Alta Performance (H.P.L.C), es una técnica de separación cromatográfica sensible y de fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas.	Medición y obtención de los resultados de concentración del analito mediante la aplicación del método analítico.	Intervalo de tipo cuantitativo - Conforme - No conforme	- Método analítico	Nominal	Cuantitativo

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ÍNDICES	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. **- PRECISIÓN:** Grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. **- REPETITIVIDAD:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. **- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:** Mínima cantidad de analito que se puede cuantificar. **- SENSIBILIDAD:** La sensibilidad de un método analítico correspondiente a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significado. **- LINEALIDAD:** Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.	Obtención de todos los resultados de los parámetros de validación y su comparación con los valores establecidos, el resultado indica la confiabilidad del método analítico.	**Precisión:** Repetibilidad y precisión intermedia. %RSD < 2,68 %RSD < 4,00 **Exactitud:** t exp < t tablas **Límite de detección:** Resultado de valor mínimo de detección. **Límite de cuantificación:** Resultado de valor mínimo de cuantificación **Linealidad:** r mínimo = 0,99 r2 mínimo = 0,995	Parámetros de validación (características de desempeño)	Nominal	Cuantitativo

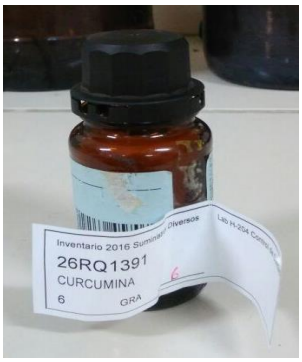
Anexo 2. Reactivos utilizados.

a. Acetonitrilo para HPLC



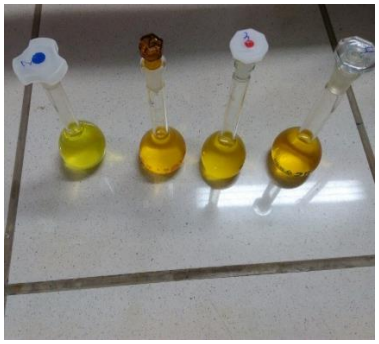
b. Ácido acético glacial

c. Metanol para HPLC



d. Curcumina Estándar

e. Muestras de Cúrcuma



f. Disoluciones de las muestras

Anexo 3. Materiales.

a. Viales de color ámbar

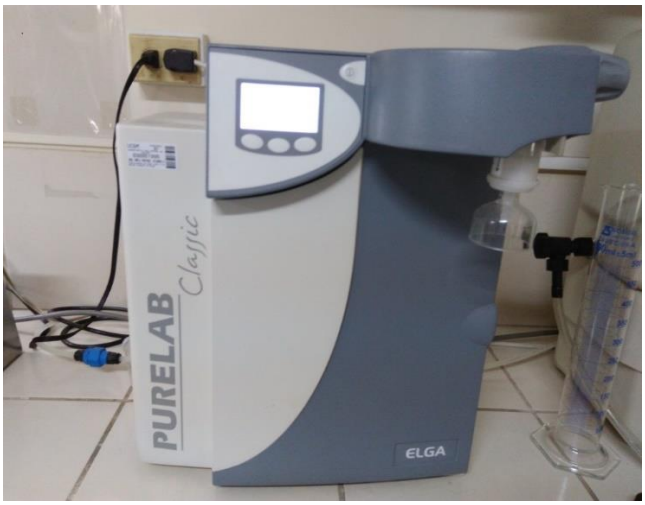
b. Filtro de Membrana

c. Fiolas de 25 mL

Anexo 4. Equipos.

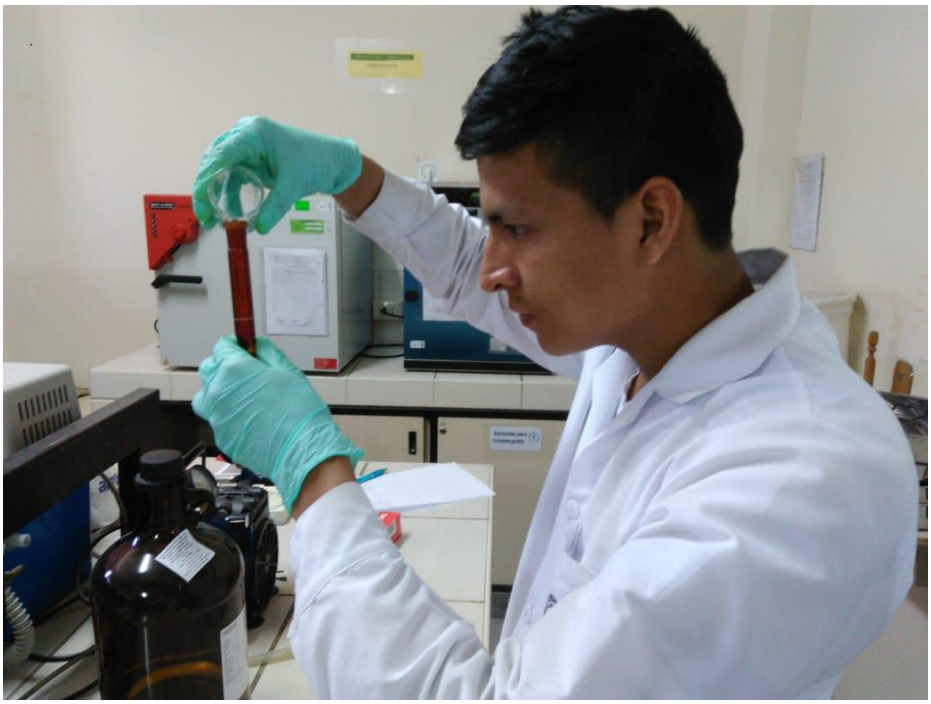
a. Balanza Analítica.

b. Equipo de baño Ultra Sonido.

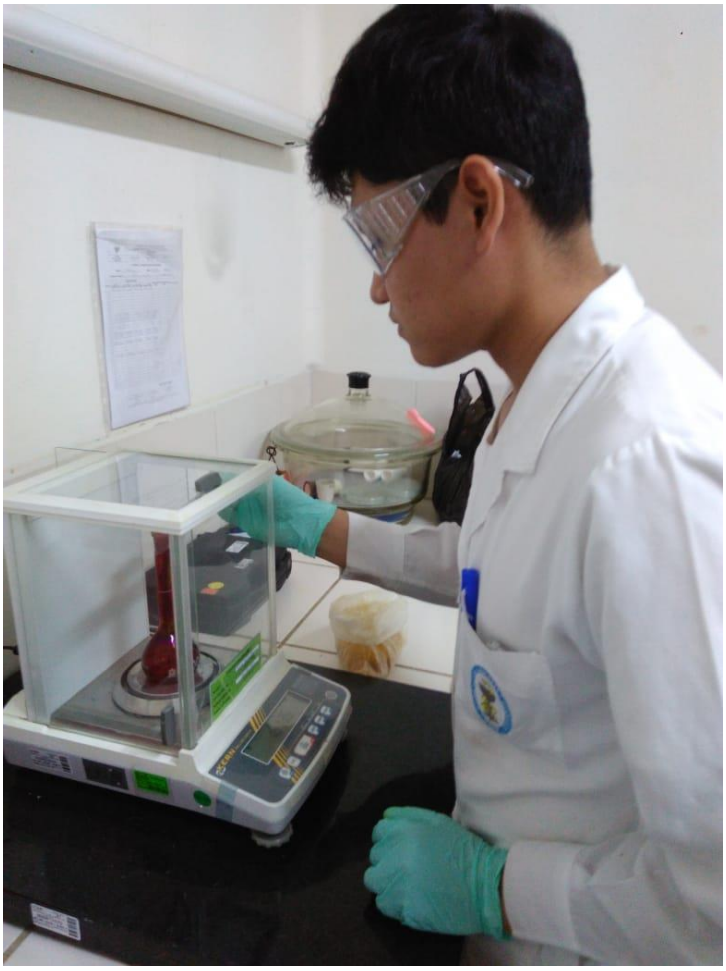


c. Equipo de destilador de Agua Ultra Pura.

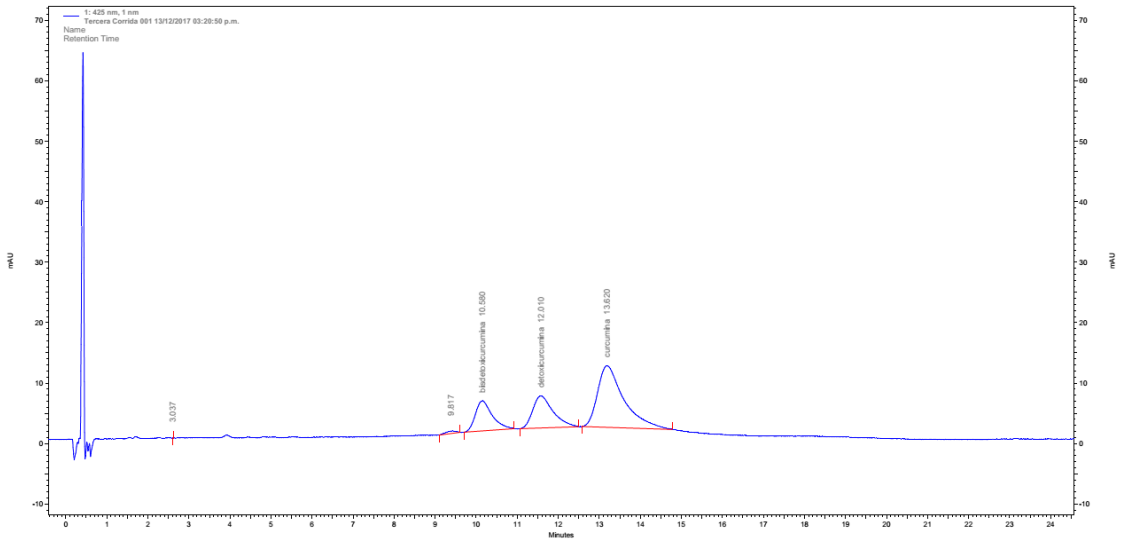
Anexo 5. Analista A, disolviendo la muestra de palillo comercial con metanol.



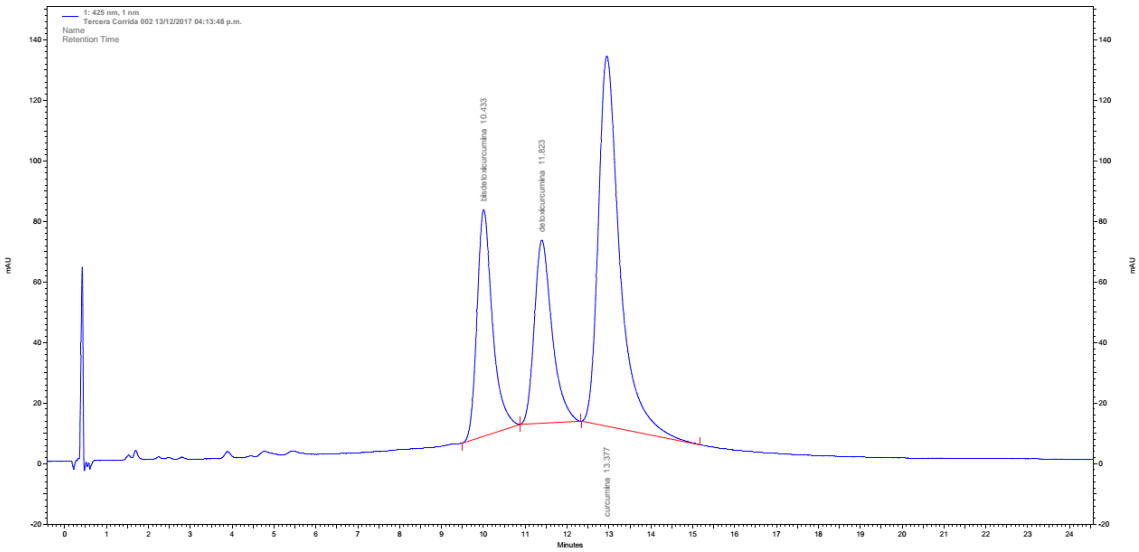
Anexo 6. Analista B, pesando las muestras de palillo comercial.



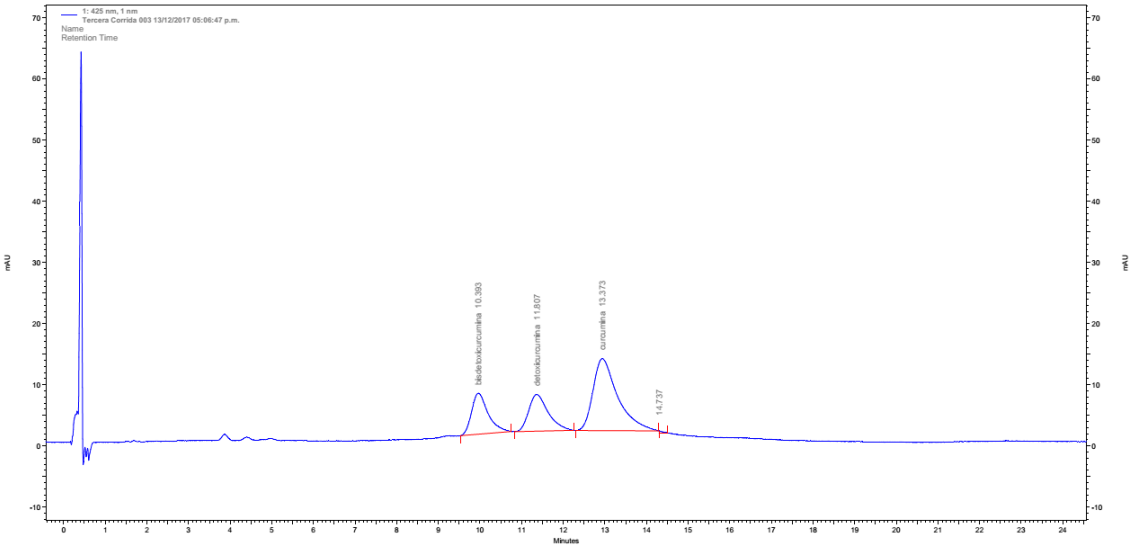
Anexo 7. Cromatogramas de las muestras.



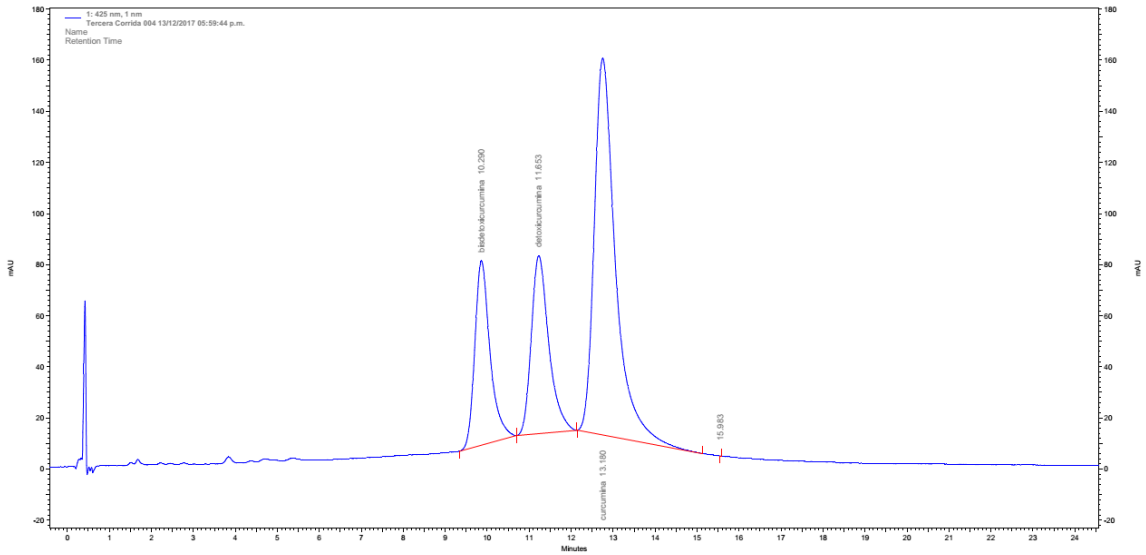
a. Cromatograma de la Muestra A.



b. Cromatograma de la Muestra B.



c. Cromatograma de la Muestra C.



d. Cromatograma de la Muestra D.