

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,**  
**BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO 1,5-DICAFEILOQUÍNICO (CINARINA) POR  
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN  
PRODUCTOS COMERCIALES DE ALCACHOFA, AREQUIPA - 2015”**

Proyecto de Tesis presentado por los Bachilleres en  
Farmacia y Bioquímica:

CCENCHO HUAYHUA JORGE ALEJANDRO

VALERO QUISPE GIULIANA ESTHER

Para Optar por el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor:

JOSÉ VILLANUEVA SALAS, PhD.

Arequipa – Perú

## AGRADECIMIENTOS

A Dios Nuestro Señor, quien hoy permite que estemos a puertas de alcanzar uno de nuestros primeros logros después de egresados.

A nuestros padres, por su apoyo incondicional.

A nuestros hermanos, quienes aun con amino de molestar nos incentivan a continuar y no rendirnos ante cada tropiezo.

A nuestros docentes, por habernos guiado en nuestra formación profesional, en especial a nuestro asesor quien confió e insistió para el término de este proyecto.

## INDÍCE

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
1. <i>Cynara scolymus</i> L. (ALCACHOFA)	5
1.1. DESCRIPCIÓN	5
1.2. TAXONOMÍA	6
1.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA	7
1.4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	7
1.5. INVESTIGACIONES REALIZADAS SOBRE LOS EFECTOS TERAPÉUTICOS	8
1.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA	9
1.7. ACCIONES FARMACOLÓGICAS DE LA ALCAHOFA	11
1.8. FARMACOCINÉTICA	12
1.9. ÁCIDOS FENOLICOS	12
2. CROMATOGRAFÍA	14
2.1. DEFINICIÓN	14
2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	14

3. VALIDACIÓN	21
3.1. DEFINICIÓN	21
3.2. RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	21
3.3. REQUERIMIENTOS PARA LA VALIDACIÓN	22
3.4. PARÁMETROS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	22

## CAPÍTULO II

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN	26
2. MATERIALES	26
2.1. MUESTRAS	26
2.2. EQUIPOS Y APARATOS	28
2.3. REACTIVOS	28
2.4. MATERIALES DE LABORATORIO	28
2.5. OTROS MATERIALES	29
3. METODOS	29
3.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	29
3.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	29
4. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	31
4.1. FUNDAMENTOS	32
4.2. PROCEDIMIENTO	32
5. VALIDACIÓN	34
5.1. SELECTIVIDAD	35
5.2. LINEALIDAD	36
5.3. PRECISIÓN	38
5.4. EXACTITUD	41
6. ANALISIS DE MUESTRAS COMERCIALIZADAS	42

## CAPÍTULO III

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
1. PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	44
1.1. SELECTIVIDAD	43
1.2. LINEALIDAD	47
1.3. PRECISIÓN	51
1.4. EXACTITUD	55
2. ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALIZADAS	57
3. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE MUESTRAS	94

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>103</b>
<b>SUGERENCIAS</b>	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>106</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>111</b>



## RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló para determinar el contenido de cinarina en productos comerciales que contengan *Cynara scolymus L.* (alcachofa) mediante la técnica analítica de: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para la evaluación del contenido de cinarina se utilizaron productos comercializados en la ciudad de Arequipa, cuya identificación y cuantificación se realizó mediante la extracción asistida por ultrasonido, así la identificación de cinarina fue por un método cromatográfico y para la cuantificación de este metabolito activo fue necesaria la validación de un método analítico.

Las condiciones cromatográficas de la técnica analítica empleada se establecieron con un sistema de gradiente en fase reversa. Se evaluaron diferentes parámetros requeridos para la validación: selectividad, linealidad, exactitud y precisión.

El primer parámetro que se evaluó fue la selectividad en donde no se evidenció interferencia de productos de degradación; la linealidad fue determinada mediante el coeficiente de correlación obteniendo un valor de 0.998 indicando una buena correlación entre la concentración y el área; la precisión se determinó por medio de la repetibilidad del sistema instrumental, del método y la precisión intermedia obteniendo RSD de

1.03%, 1.18% y 1.05% respectivamente; la exactitud se evaluó mediante la recuperación del análisis obteniendo un valor promedio cercano al 100%. Los resultados de estos parámetros de desempeño se encuentran dentro de los criterios de aceptación demostrando así que el procedimiento analítico propuesto es selectivo, lineal, exacto y preciso.

Una vez estandarizado el método se prosiguió analizar 16 productos de 6 marcas comerciales diferentes que contienen alcachofa asignándoles un código de análisis para diferenciarlas como (A, B, C, D, E y F), los cuales fueron adquiridos en diferentes casas naturistas y otros puntos de venta; los resultados que se obtuvieron en 3 de los grupos de estudios presentan contenidos muy variados y por debajo de lo esperado.

El valor establecido por Dietary Supplements and Herbal Medicines (DSHM) con relación al contenido de cinarina en alcachofa establece como valor mínimo el 5% del contenido en estos suplementos nutricionales, equivalente a 25 mg/cap.; el producto “A” presentó valores constantes en sus 3 diferentes lotes teniendo como valor promedio 4.979 %, los productos “B”, “C” y “D” muestran resultados promedio de 2.895, 3.844 y 4.114 % respectivamente, los productos “E” y “F” tienen como resultado promedio 4.786 y 4.809 % respectivamente.

## ABSTRACT

This work was developed to determine the content of cinarina in commercial products containing *Cynara scolymus* L. (artichoke) by an analytical technique, high performance liquid chromatography (HPLC).

For the evaluation of the content of cinarina marketed in the city of Arequipa, whose identification and quantification was performed by extraction assisted by ultrasound products and the identification of cinarina was by a chromatographic method and for quantifying the active ingredient was used it was necessary validation of an analytical method.

The chromatographic conditions were established with a gradient system reverse phase. different parameters required for validation were evaluated for the selectivity noninterference of degradation products was shown, the correlation coefficient was 0.998, a value that indicates a good correlation between the concentration and the area being the straight-line method repeatability instrumental system with a RSD of 1.03% and 0.42% was obtained, the repeatability of the calculated method by RSD was 1.18%, intermediate precision resulted in an RSD of 1.05%, analyte recovery was found with a near average value 100 %, the results of these performance parameters have shown that the proposed analytical procedure is selective, linear, accurate and precise.

Once standardized method was continued to analyze 16 products from 6 different trademarks containing artichoke assigning them a code analysis to differentiate as; (A, B, C, D, E and F), which were acquired in different homes and other health food outlets; the results obtained in 3 groups of studies have varied content and lower than expected.

The value set by Dietary Supplements and Herbal Medicines (DSHM) regarding the content of cinarina in artichoke establishes minimum 5% of the content of these nutritional supplements, equivalent to 25 mg / cap .; the product "A" present constant values in 3 different lots having an average value of 4.979%, the products "B", "C" and "D" show average results of 2.895, 3.844 and 4.114% respectively, the products "E" and "F" have an average of 4.786 and 4.809% result respectively.



## INTRODUCCIÓN

La *Cynara scolymus L.* (Alcachofa) es originaria de la región mediterránea de Europa; cultivada en países con climas templados, en el Perú se cultiva en diferentes zonas de la Costa y Sierra, en los últimos años se ha convertido en un producto de exportación de bandera de nuestro país; <sup>1,2</sup> la alcachofa ha sido utilizada en la medicina tradicional durante siglos como remedio específico para el hígado y la vesícula biliar.<sup>3</sup>

La alcachofa contiene numerosos compuestos químicos, uno de los principales ingredientes activos es la cinarina que se encuentra en las hojas, brácteas y corazón, la cinarina ha demostrado efectos significativos de protección y regeneración hepática, puede ser útil para la protección contra el crecimiento y la supervivencia de las células potencialmente cancerosas, buena acción hipoglucemiante e hipocolesterolémico; por lo que se ve un incremento masivo del consumo de este producto en la población, resultado de ello se viene elaborando productos farmacéuticos a base de alcachofa.<sup>4,5,6,7</sup>

Una de las mayores desventajas de los productos naturales es que no cuentan con un control de la materia prima y productos terminados, debido a que existen pocos estándares de referencia en el mercado y metodologías confiables que permitan un control adecuado de sus ingredientes activos. En este trabajo se validó el desarrollo de

una técnica analítica que permite determinar el contenido de cinarina presente en productos comerciales de alcachofa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),<sup>1</sup> la metodología usada para la validación se realizó según las recomendaciones que indica la USP 37 y la AEFI.

Por las razones antes mencionadas es de interés nuestro realizar un control del contenido de este ingrediente activo al producto terminado ya que se cuenta con los recursos humanos, físicos y económicos.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de cinarina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en productos comercializados de alcachofa en la ciudad de Arequipa.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una técnica analítica para la determinación de cinarina.
2. Validar una técnica analítica para determinar cinarina.
3. Cuantificar el contenido de cinarina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en diferentes productos de alcachofa.
4. Comparar los resultados obtenidos de cinarina en los diferentes productos comerciales.
5. Evaluar los resultados de los diferentes productos comerciales con relación a su contenido.

## HIPÓTESIS

Dado que la *Cynara scolymus L.* (Alcachofa) contiene en su composición ácido 1,5-dicafeoilquínico “cinarina”, es probable que este pueda ser determinado y cuantificado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en diferentes productos que se comercializan en la ciudad de Arequipa.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1. *Cynara scolymus L.* (ALCACHOFA)

#### 1.1. DESCRIPCIÓN

La alcachofa es una planta herbácea perenne de hasta 2 m de altura, originaria del mediterráneo, islas canarias y Egipto. La alcachofa ya era conocida por los antiguos egipcios, griegos y romanos; actualmente se cultiva en climas templados como hortaliza; los principios activos de la alcachofa se encuentran localizados en toda la planta ya sea en hojas, brácteas y corazón, es decir el consumo de cualquiera de estas partes de la hortaliza va a mostrar efectos benéficos hacia los consumidores.<sup>4,5,6</sup>

Las flores se encuentran agrupadas en capítulos gruesos de 10-15 cm de diámetro, insertas sobre tallos fuertes, ramificados acanalados, con hojas sésiles, casi enteras; mundialmente se utiliza con fines alimenticios.<sup>1,5,7</sup>

Las hojas de alcachofa se caracterizan por su elevado contenido en flavonoides y ácidos fenilpropiónicos (alrededor 1% - 4%) a las cuales se le atribuyen varias propiedades farmacológicas, se usan con fines medicinales en preparaciones terapéuticas con especial indicación en afecciones hepáticas; en la alimentación se usa principalmente el receptáculo tierno, carnoso, con las brácteas sepaloideas.<sup>1, 3, 8, 9</sup>

El fruto fresco de la alcachofa Figura N°1, está protegida por las hojas carnosas llamadas brácteas las cuales son brillantes y cerradas, es cosechado antes del florecimiento cuando este presenta puntas negras y el lado interno ha formado vellosidad es indicativo de su madures, es consumido crudo, hervido y al vapor, el contenido de compuestos fenólicos varía entre los diferentes cultivos y se ve afectada por diferentes factores, como la edad, las condiciones agronómicas y postcosecha.<sup>8, 10, 11</sup>



**Figura N° 1: Corte transversal del fruto de la alcachofa**

## 1.2. TAXONOMÍA

Según la clasificación taxonómica propuesta por Linneo, la posición sistemática de la alcachofa es la siguiente:

- **Reino** : *Plantae*

- **División** :*Magnoliophyta*
- **Clase** :*Magnoliopsida*
- **Orden** :*Asterales*
- **Familia** :*Asteraceae*
- **Subfamilia** :*Cichorioideae*
- **Tribu** :*Cardueae*
- **Subtribu** :*Echinopsidinae*
- **Género** :*Cynara*
- **Especie** :*C. scolymus*

### 1.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA <sup>11, 12</sup>

Las condiciones climáticas son importantes para la producción de alcachofa, es una hortaliza de invierno crece a temperaturas diurnas de 24°C y nocturnas de 13°C, libre de heladas, los climas cálidos y secos provocan que las hojas del fruto (brácteas) se abran. El sistema radicular de la alcachofa puede adaptarse a multitud de suelos, pero prefiere suelos profundos, fértiles y bien drenados, los suelos deben ser llanos, soporta mal el exceso de humedad puede adaptarse a suelos con pH ligeramente alcalino de 5.5 a 7.0, es una planta resistente a la salinidad, pero un exceso ocasiona necrosis en las brácteas internas.

### 1.4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA <sup>12, 13, 14</sup>

**Planta:** Vivas, perenne que puede considerarse como bianual y triannual, conservándose en campos muy abonados, tallos erguidos, gruesos, anclados longitudinalmente y ramificados con más de 1 m de altura.

**Sistema radicular:** Extraordinariamente potente, lo que permite adaptarse a una extensa gama de suelos. Se inserta en un rizoma muy desarrollado en el que se acumulan las reservas alimenticias que elabora la planta, que permiten su multiplicación y rebote.

**Sistema caunilar:** Constituido principalmente por un conjunto de hojas grandes, dispuestas alternadamente sobre un tallo corto y comprimido para conformar una gran roseta que puede medir entre 0,5 y 1,5 mm de diámetro.

**Hojas:** Alargadas, alcanza los 50 cm. De altura, son pinatipartidas. La cara superior del limbo es gris verdosa, la inferior es blanca, cubierta de pelillos y recorrida por nerviaciones marcadas.

**Fruto:** Es un aquenio provisto de vilano, de forma oblonga y color grisáceo, que son considerados como la semillas de la planta con una capacidad germinativa de 6 a 12 años.

## 1.5. INVESTIGACIONES REALIZADAS SOBRE LOS EFECTOS TERAPÉUTICOS

**Efecto gastrointestinal:** Algunos estudios evaluaron los efectos de extracto de hoja seca en pacientes con dispepsia donde los trastornos digestivos se redujeron significativamente, en un 71%, durante el período de tratamiento.

El extracto de hoja de *Cynara scolymus* para el tratamiento de pacientes con dispepsia funcional han mostrado una clara mejoría de los síntomas incrementando significativamente la cantidad de secreción de bilis en el duodeno, y a la vez mostrando efectos antieméticos y espasmolíticos.<sup>7,20</sup>

**Efecto hipolipemiente:** Ensayos clínicos evaluaron los efectos del extracto acuoso de las hojas de alcachofa con relación a los niveles de colesterol

observando la reducción en los niveles de colesterol total, resultados similares se han obtenido donde a voluntarios sanos a los que se administró una dosis de 1,2 g de extracto normalizado de alcachofa durante 12 semanas, redujeron significativamente el colesterol total; la administración de 1,8 g de extracto de alcachofa por día disminuye la hiperlipoproteinemia en pacientes con niveles de colesterol superiores a 280 mg/dL.<sup>5, 21, 22, 23</sup>

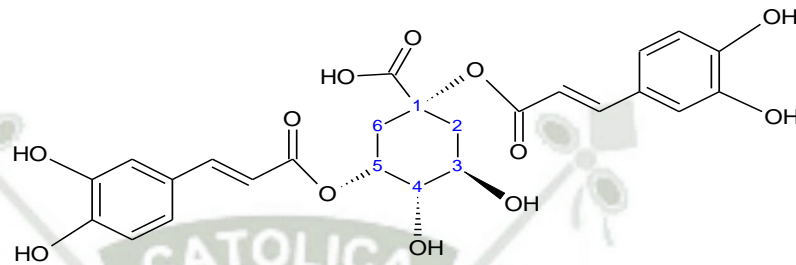
**Efecto hepatoprotector:** Extractos de alcachofa a concentraciones entre 0,08 y 0,5 mg/ml fueron capaces de prevenir la formación de transformaciones membrana canalicular dependiente de la dosis; la actividad hepatoprotectora de la cinarina contra el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en hepatocitos aislados de rata se compararon la cinarina y, en menor medida, cafeico ácido mostrando un efecto citoprotector, produciendo una disminución significativa en glutámico-oxalacético transaminasa, glutámico-pirúvica transaminasa (también conocido como la alanina aminotransferasa o ALT), directa los niveles de bilirrubina y de glutatión, lo que indica una reducción en el potencial de hepatotoxicidad.<sup>4, 24, 25, 26, 27</sup>

**Otros efectos:** La cinarina potenciada por los otros componentes de la alcachofa, produce un intenso efecto colerético (aumento de la secreción biliar), acción colagoga (facilita el vaciamiento de la vesícula biliar), aumento de la diuresis (producción de orina) y acción hipoglucemiante.<sup>28, 29, 30</sup>

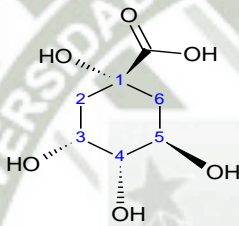
## 1.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La parte de la planta con mayor interés medicinal son las hojas y el fruto donde sus principales componentes químicos son los derivados de ácido fenólico incluyendo los ácidos cafeoilquínicos, flavonoides, sesquiterpenos y varios ácidos alifáticos especialmente los hidroxiácidos.

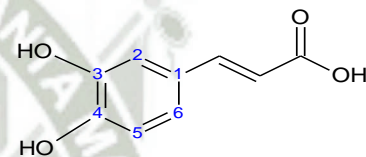
- Compuestos polifenólicos: Destaca sobre todo la cinarina Figura N°2, un derivado de ácido quínico Figura N°2.1, que contiene dos unidades de ácido cafeico Figura N°2.2, unidas al ácido quínico formando un éster (ácido 1,5-dicafeoilquinico) también contiene ácido cafeico libre y ácido clorogénico.<sup>31</sup>



**Figura N°2: Cinarina**

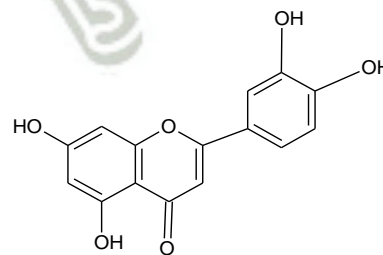


**Figura N°2.1: Ácido  
Quínico**

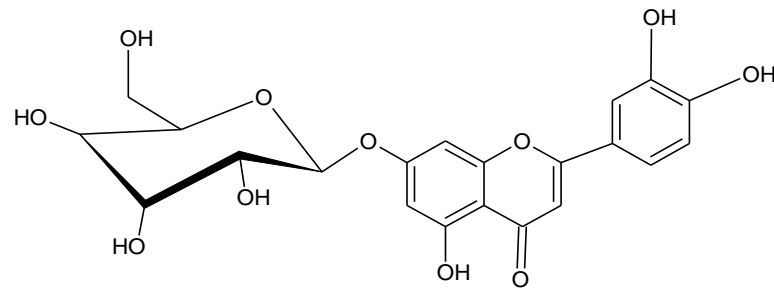


**Figura N°2.2: Ácido  
Cafeico**

- Flavonoides: Importantes también farmacológicamente porque presentan sinergia con los principios activos. Por su estructura son derivados de la luteolina Figura N°3 y están en forma de heterosidos, muestra el cinarósido glucosido de luteolina Figura N°3.1.<sup>31</sup>

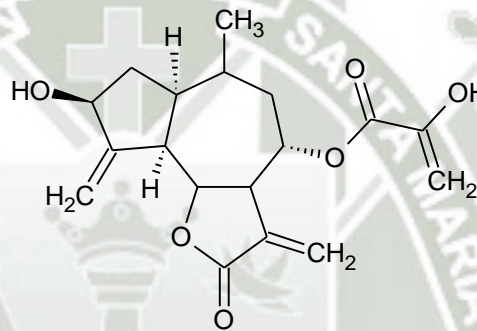


**Figura N°3: Luteolina**



**Figura N°3.1: Cinarosido**

- Lactona sesquiterpenica: Cinaropicrina es un principio amargo, estructura molecular se muestra en la Figura N°4. <sup>31</sup>



**Figura N° 4: Estructura molecular de Cinaropicrina**

### 1.7. ACCIONES FARMACOLÓGICAS DE LA ALCAHOFA

Las principales acciones farmacológicas están relacionadas con los procesos que intervienen en la digestión: coleréticas, colagoga, hepatoprotectoras e hipocolesterolemiantes; además de tener efecto sobre la hiperglucemia; en las que parecen intervenir los derivados cafeilquinicos, en especial la cinarina, el ácido clorogénico y las lactonas sesquiterpenicas como la cinaropicrina; estos efectos están bien documentados, tanto en estudios en animales de experimentación como clínicos. Estudios en humanos han demostrado su actividad coleretica. <sup>7, 12, 15,16, 17</sup>

## 1.8. FARMACOCINÉTICA

La ruta metabólica después de la administración de ácidos dicafeoilquinicos, se absorbe en su mayoría en el colon sin embargo se ha sugerido que una minoría se absorbe en el intestino superior 30% aproximadamente (después de haber entrado al sistema circulatorio) donde se ha encontrado que se acumula en el plasma y su concentración más alta ocurre en 6 a 7 horas después de su consumo.

En el colon se ha encontrado bacterias en la microflora que tienen actividades esterases para los ácidos dihidrofelurico el cual es un metabolito secundario de los ácidos dicafeoilquinico. La eliminación se lleva a cabo por medio de la orina en hidroxicinamatos conjugados y no conjugados.<sup>19</sup>

## 1.9. ÁCIDOS FENÓLICOS

Entre las plantas medicinales que poseen ácidos fenólicos vamos a destacar la alcachofa con actividad colerética, este grupo de compuestos se caracteriza por poseer en su estructura química el anillo aromático, un grupo hidroxilo y una función carboxílica.

### 1.9.1. CINARINA

La cinarina es un ácido fenólico; químicamente, es un éster formado a partir de ácido quínico y dos unidades de ácido cafeico, Figura N°2; los compuestos fenólicos son un grupo muy común de metabolitos secundarios presentes en las plantas son de carácter ácido, solubles en disolventes orgánicos polares y tienen poder reductor.<sup>31,32</sup>

El ácido 1,5-dicafeoilquínico (cinarina) se encuentra presente en toda la planta y además se considera uno de los principales compuestos químicos activos;<sup>15</sup> su forma molecular es  $C_{25}H_{24}O_{12}$  la cual presenta un peso molecular de 516.46 g/mol. La molécula pura de cinarina se presenta como polvo fino de color blanco.<sup>1, 7, 33</sup>

Wójcicki J, et al (2004), realizó un estudio del efecto del ácido 1,5-dicafeoilquínico (cinarina) sobre los niveles de colesterol total en el suero y el hígado de las ratas agudas tratados con etanol, en ratas tratadas con etanol solo, el suero y el colesterol hepático mostraron un aumento significativo entre un 44 y 75%, respectivamente mientras que las ratas que recibieron etanol y cinarina simultáneamente, mostraron una clara reducción de los niveles séricos de colesterol.<sup>23</sup>

Cao X. et al (2010), demostraron que el ácido 1,5-dicafeoilquínico tiene propiedades antioxidantes que regulan el alza de la síntesis de glutatión (principal antioxidante de las células, protege de especies reactivas del oxígeno como los radicales libres y los peróxidos) mediante la estimulación de la vía Nrf2 (proteína de gran alcance que está latente dentro de cada célula del cuerpo) en astrocitos corticales y los protege de la muerte celular y reperfusión.<sup>29</sup>

Gezer R et al (2007), probaron los efectos de diferentes dosis de cinarina sobre la proliferación celular y la morfología demostrando que era dependiente de la dosis y tipo de célula, siendo útil para la protección contra el crecimiento y la supervivencia de las células potencialmente cancerosas y puede promover la normalidad de la longevidad de las células mediante la inducción de proteínas SR (respuesta al estrés proliferativa).<sup>34, 35</sup>

## 2. CROMATOGRAFÍA

### 2.1. DEFINICIÓN

La cromatografía es un método, usado para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel, puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa.<sup>36, 37</sup>

### 2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación perteneciente a la cromatografía de elución, donde un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (análito) en la corriente de fase móvil, cada analito avanza a lo largo del sistema con velocidades diferentes las cuales dependerán de la afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente estando separadas.<sup>36, 38</sup>

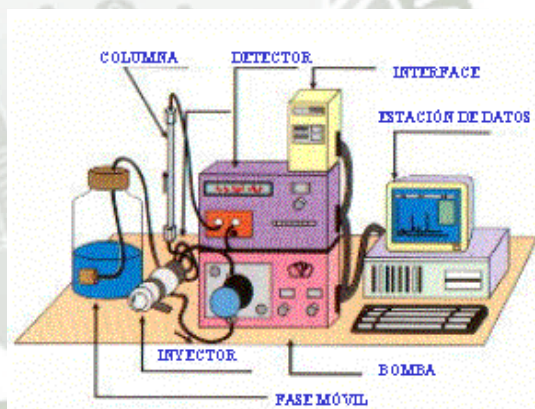
#### 2.2.1. BASES DE LA SEPARACIÓN<sup>37</sup>

La cromatografía líquida es un método separativo, la columna es donde se produce la separación puede considerarse así el corazón del sistema cromatográfico; el cromatógrafo líquido Figura N°5, está constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema inyector que permite la introducción de la muestra.
- Un sistema de bombeo que fuerza el paso de la muestra y fase móvil a través de la columna.
- Un sistema detector que permite el monitoreo de la solución que emerge de la columna.
- Un sistema de registro de los datos proveniente del detector.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtiene dos productos:

- Un cromatograma que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elución.
- Un eluido o eluato que es el fluido proveniente de la columna que contiene la fase móvil y los componentes de la muestra separados.



**Figura N° 5: Esquema del Cromatografo Líquido de Alta Resolución**

### 2.2.2. CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA<sup>38</sup>

La cromatografía en fase reversa se aplica en equipo de alta resolución (HPLC), todas las formas de cromatografía de líquidos son procesos de

migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil. En la cromatografía de fase reversa (RPC) se utiliza un empaque hidrofóbico, usualmente un grupo funcional octadecilo u octilo y una fase móvil polar.

#### **A. FASE ESTACIONARIA PARA CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA:**<sup>38</sup>

Es una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. Los soportes para casi todos los rellenos se preparan con sílica rígida, formada por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, la sílica presenta las ventajas de resistir la aplicación de altas presiones sin contraerse, y de no expandirse al contacto con los solventes, tiene la desventaja de ser químicamente inestable; a un pH que sea menor de 3 los ligandos unidos a la sílica pueden ser removidos y a un pH mayor de 7.5, la sílica se solubiliza.

La cromatografía de fase reversa es un proceso de partición en donde los solutos están distribuidos entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Los solutos no polares tienden a adsorberse en la fase estacionaria y se mueven a través del sistema más lentamente que los solutos polares.

Cuando un soluto se disuelve en agua, las fuerzas de atracción entre las moléculas de agua se distorsionan o se rompen. Únicamente los solutos altamente polares o iónicos pueden interactuar con la estructura del agua. Los solutos no polares casi no interactúan con estas estructuras y como consecuencia “abandonan” la fase móvil para adsorberse al hidrocarburo de la

fase estacionaria. La fuerza motriz de la retención no es la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, sino el efecto de repulsión del disolvente por el soluto.

## **B. FASE MOVIL PARA CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA:**<sup>38</sup>

Entre menos polar sea la molécula que se va a purificar, se requerirá una fase estacionaria más hidrofóbica. Sin embargo, si la muestra resulta ser muy afín a la matriz, la elución se dificultaría. Así que debe hacerse un análisis cuidadoso de la molécula de interés y determinar la naturaleza química de los contaminantes asociados. La retención hidrofóbica del soluto en la fase estacionaria puede disminuirse añadiendo un disolvente orgánico a la fase móvil acuosa. Al disminuir la polaridad de la fase móvil, la distribución de los solutos se cambia hacia la fase móvil.

La porosidad de las partículas de la fase estacionaria también es un factor importante que influye en la capacidad de unión. Los poros grandes facilitan la interacción del soluto con el ligando. Cuando se requiera una capacidad de unión máxima, deberá escogerse una matriz que contenga poros suficientemente grandes, capaces de alojar todas las moléculas de interés.

### **2.2.3. INSTRUMENTACIÓN**

#### **2.2.3.1. RESERVORIO DE FASE MÓVIL:**<sup>37</sup>

Todos los equipos de HPLC pueden emplear como reservorio de fase móvil cualquier frasco de laboratorio de buena calidad de

vidrio o polímero resistente, una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema; un requisito importante es que los disolventes empleados deben carecer de gases disueltos, ya que estos pueden provocar serios problemas por formación de burbujas. Es frecuente por ello la desgasificación de los disolventes.

#### **2.2.3.2. TUBERÍAS** <sup>37</sup>

La fase móvil empleada circula por tuberías la cuales conectan por todo el sistema cromatográfico, las tuberías deberán ser inertes, resistente a altas presiones y de longitudes no demasiado largas ya que conducen al ensanchamiento extracolumnares.

#### **2.2.3.3. UNIONES** <sup>37</sup>

Permiten la conexión de tuberías y con ella distintos componentes del sistema cromatográfico, las uniones deben reunir determinadas características como: ser inerte a fases móviles y muestras, cerrar herméticamente y no deben contribuir en forma notable el ensanchamiento de banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos.

#### **2.2.3.4. BOMBA** <sup>37</sup>

La fase móvil proveniente del reservorio de solvente es impulsada por la bomba hacia el inyector y desde allí hacia la columna, están construidas de materiales resistentes tanto al

ataque químico como al desgaste mecánico; su caudal de trabajo puede ser muy variable dependiendo de la escala de trabajo escogida.

#### **2.2.3.5.SISTEMA DE GRADIENTE**

La cromatografía líquida isocrática, es capaz de separar un número limitado de picos, la composición de la fase móvil no se va modificando es decir permanece constante durante la separación; cuando la polaridad de componentes a separar es muy compleja es posible que la modalidad isocrática no sea capaz de resolverlos, se puede optar otra alternativa.<sup>22</sup>

Cromatografía líquida en gradiente, va modificando la composición de la fase móvil durante la separación. Para trabajar en esta modalidad el cromatografo debe disponer de un sistema de programación de gradiente, que permita la mezcla reproducible de disolventes en distintas proporciones.<sup>37, 40</sup>

#### **2.2.3.6. INYECTORES**<sup>37</sup>

El inyector permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema; debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte del ataque químico y capaz de soportar altas presiones.

- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.

#### 2.2.3.7. DETECTORES<sup>37</sup>

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica; deben reunir ciertas características como:

- Tener un amplio rango dinámico de respuesta, donde el rango de concentraciones de una sustancia en análisis produce un cambio en la señal de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- Tener la sensibilidad apropiada.
- No afectarse por cambios de temperatura.

#### 2.2.3.8. SISTEMA DE TOMA Y PROCESAMIENTO DE DATOS.<sup>37</sup>

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico cromatográfico, cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cuantitativas y cualitativas. Este registro se obtiene a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar:

- Registrador gráfico: que convierte la señal en un gráfico tipo X-Y.
- Integrador: que permite no solo obtener un registró grafico sino que también su tratamiento matemático para el cálculo de sus concentraciones.

### 3. VALIDACIÓN

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.<sup>40</sup>

#### 3.1. DEFINICIÓN:

El termino validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo: especificar e implementar, aprobar y documentar.<sup>41</sup>

#### 3.2. RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS<sup>41</sup>

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizara el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos.

- Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto de registro de especialidades farmacéuticas como de las buenas prácticas de laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

### 3.3. REQUERIMIENTOS PARA LA VALIDACIÓN <sup>41, 42, 43</sup>

Diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación, las categorías de prueba más habituales son:

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármaco a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II:** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- **Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p. ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación.

### 3.4. PARÁMETROS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO:

Para el desarrollo de una validación se debe tener en cuenta los siguientes parámetros.

### 3.4.1. SELECTIVIDAD <sup>41, 44, 45</sup>

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

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir e identificar simultánea o separadamente los análisis de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Frecuentemente el término especificidad se utiliza como su sinónimo, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuestas solo a un único análisis, el término selectividad es normalmente más apropiado.

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

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos)
- Distorsionar la respuesta del análisis (afectan normalmente a la pendiente y ordena en el origen de la recta de calibrado) .Este efecto puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.

### 3.4.2. LINEALIDAD<sup>41, 46, 47</sup>

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de análito y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez.

Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de análito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación de una curva de estándar.

### 3.4.3. PRECISIÓN<sup>41, 47, 48</sup>

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación.

En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración.

La precisión intermedia también conocida como tolerancia o fortaleza expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en

diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo.

#### 3.4.4. EXACTITUD <sup>41, 48, 49</sup>

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿Cuál es el valor verdadero del análisis en la muestra? Por desgracia el valor verdadero en muchos casos se desconoce como, por ejemplo, en la industria alimentaria debido a la gran variedad de matrices posibles y que prácticamente no existen patrones de referencia certificados por organismos oficiales.

## CAPÍTULO II

# MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo fue realizado en la Universidad Católica de Santa María en los laboratorios del pabellón H-103 y H-104.

### 2. MATERIALES

#### 2.1. MUESTRAS

Se seleccionó 6 diferentes productos farmacéuticos dispensados en la ciudad de Arequipa que contengan *Cynara scolymus L.* a cada muestra se le asignó un código (A, B, C, D, E y F), con el objetivo de diferenciarlas, en la Tabla N° 3 muestra los 6 productos adquiridos.

**Tabla N° 3: Identificación codificada de muestras**

<b>Identificación de muestras</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Código</b>	<b>Lote</b>	<b>Procedencia</b>
"A"	A <sub>1</sub>	10903575	Casa Naturista- Cercado
	A <sub>2</sub>	10802955	Casa Naturista- Cercado
	A <sub>3</sub>	10803205	Casa Naturista- Cercado
"B"	B <sub>1</sub>	1E30965	Casa Naturista- Cercado
	B <sub>2</sub>	1E30275	Casa Naturista- Cercado
	B <sub>3</sub>	1E30455	Casa Naturista- Cercado
"C"	C <sub>1</sub>	10113034	Mercado Central San Camilo
	C <sub>2</sub>	10432915	Mercado Central San Camilo
"D"	D <sub>1</sub>	61553RR	Mercado Central San Camilo
	D <sub>2</sub>	61551RR	Mercado Central San Camilo
	D <sub>3</sub>	65234RR	Casa Naturista- Cercado
"E"	E <sub>1</sub>	10104335	Casa Naturista- Cercado
	E <sub>2</sub>	10702745	Casa Naturista- Cercado
"F"	F <sub>1</sub>	20150112	Casa Naturista – Cercado
	F <sub>2</sub>	20369312	Mercado Central San Camilo
	F <sub>3</sub>	20568613	Casa Naturista- Cercado

U

**Fuente: Elaboración Propia**

## 2.2. EQUIPOS Y APARATOS

- Sistema de HPLC LaChrom
- Detector: MERCK HITACHI UV L-7400
- Bomba: MERCK HITACHI UV L-7100
- Interface: MERCK HITACHI UV L-7000
- Columna: Chromolith Performance RP 18 –(100X4.6mm)
- Software: EZChrom Elite
- Balanza analítica (OHAUS Pioneer)
- Vortex (Anelo Vortex-Mixer)
- Centrifuga (Hettich EBA-20)
- Estufa (Menmert UM 100)
- Potenciómetro (Titranto 808 Methohm)
- Baño de ultrasonido (J.P. Selecta)
- Purificador (EASYPURE II)

## 2.3. REACTIVOS

- Estándar de Cinarina  $\geq 98\%$  (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.)
- Acetonitrilo grado HPLC (Tedia)
- Ácido fosfórico 85% (Merck)
- Agua calidad ultra pura
- Agua destilada

## 2.4. MATERIALES DE LABORATORIO

- Beakers de 50 mL
- Equipo de micro filtración al vacío.
- Fiolas de 500 mL y 5 mL

- Probetas de 100 mL
- Pipetas volumétricas 1, 2 y 5 mL

## 2.5. OTROS MATERIALES

- Filtros de jeringa de 100 mm 0.22  $\mu$ m ANOTOP
- Filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m MILIPORE
- Jeringa de inyección de 100  $\mu$ L para HPLC
- Jeringas descartables de 3 y 5 mL MEDICAL
- Micro pipeta automática de 200 – 1000  $\mu$ L, BRAND

## 3. METODOS

### 3.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras fueron adquiridas durante el periodo julio del 2015 a enero del 2016 de casas naturistas y puntos de ventas del mercado San camilo; se utilizaron productos cuya composición base sea *Cynara scolymus L.*, ya que existen no solo preparaciones a base de alcachofa sino también en combinación con otras especies como: boldo, cola de caballo, yacón, hinojo, etc.

### 3.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para lograr un análisis cuantitativo de confianza se comenzó por elaborar un procedimiento de extracción confiable, para esto se procedió a someter a la

muestra a tratamientos físicos como son la agitación, evaporación, filtración, sonicación y centrifugación.

### 3.2.1. CONCEPTOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

**Agitación;** Es una operación de mezclado, se refiere al movimiento inducido de un material en una forma específica, facilita el contacto y garantiza la homogeneidad, el quipo comienza a moverse circularmente generando sobre el fondo del tubo un movimiento giratorio que provoca sobre el líquido que se encuentra en su interior un movimiento en forma de vórtice, es decir un movimiento con forma de espiral.<sup>31</sup>

**Evaporación;** La concentración por evaporación a partir de una solución consiste en lograr disminuir la cantidad de solvente presente en una mezcla con el fin de aumentar la cantidad de los sólidos disueltos por unidad de volumen en este.<sup>15, 31</sup>

**Filtración;** Procedimiento empleado para separar partículas sólidas de un fluido, se puede considerar un proceso de separación de fases donde el líquido atraviesa un material poroso (filtro) permeable que impide el paso de las partículas, separándolas del material disuelto.<sup>31</sup>

**Sonicación;** Consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión. La intensa agitación producida destruye enlaces intermoleculares. Se suele aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización. Las vibraciones transmitidas por un sistema

mecánico generan ondas de ultrasonido que producen millones de burbujas microscópicas, las que se expanden y colapsan.<sup>15,31</sup>

**Centrifugación;** La centrifugación constituye el procedimiento más rápido, cómodo y limpio para separar un sólido en suspensión, de forma que las partículas más pesadas se depositen en el fondo del recipiente, mientras que las sustancias más ligeras quedan por encima.<sup>15,31</sup>

### 3.2.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO

La extracción del compuesto fenólico derivado de la alcachofa por medio de ultrasonido se llevó a cabo bajo diferentes condiciones: solvente acetonitrilo, tiempo 5 min. Se pesaron 0.1 g de muestra molida en tubos de centrifuga, se le agregó 1 mL de solvente y se agitó (Anelo Vortex-Mixer), se centrifugo (Hettich EBA-20) por un tiempo de 5 min a 50 x 100 rpm. Los experimentos se realizaron por triplicado en un equipo de ultrasonido.

Posteriormente, las muestras se filtraron utilizando papel de filtro rápido y se evaporaron con nitrógeno. Una vez evaporado totalmente el solvente, se reconstituyo con fase móvil (agua, acetonitrilo) en fiolas de 5 mL, se taparon y filtraron con filtro de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para inyectar al HPLC.

## 4. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

El análisis cuantitativo de las muestras recolectadas se realizó por HPLC usando un sistema de gradiente en fase reversa, con detección UV.

## 4.1 FUNDAMENTO

**Cromatografía líquida de alta resolución;** La cromatografía líquida es un método separativo, cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes, es una técnica que se basa en la separación de dos o mas analitos de una muestra, mediante la utilización de dos fases, una móvil y una estacionaria.<sup>37</sup>

**Cromatografía en fase reversa;** Se ha convertido en el tipo de cromatografía más utilizada en HPLC e incluye cerca de la mitad de los métodos descritos. Esta técnica proporciona retención y selectividad optima cuando las muestras tienen un carácter predominantemente alifático o aromático; Utiliza solventes polares tales como agua, acetonitrilo, metanol, entre otros; una fase estacionaria apolar que usualmente presenta un grupo funcional octadecilo u octilo.<sup>40, 52</sup>

## 4.2. PROCEDIMIENTO

### Condiciones cromatográficas:

- **Equipo:** Cromatógrafo líquido de alta resolución
- **Columna:** Chromolith RP-18 (100 x 4.6 mm)
- **Sistema:** Gradiente
- **Fase móvil:** Agua: ácido fosfórico (500:0.002) v/v, pH 3.2, acetonitrilo: ácido fosfórico (500:0.002) v/v
- **Detector:** UV, 330 nm
- **Velocidad de flujo:** 2 mL/minuto
- **Volumen de inyección:** 20 µL
- **Tiempo de retención:** 3,7 minutos aproximadamente

- **Tiempo de corrida:** 8 minutos aproximadamente

#### **Preparación de la fase móvil:**

- Agregar agua a una fiola de 500 mL y adicionar ácido fosfórico, llevar a volumen con agua.
- Agregar acetonitrilo a una fiola de 500 mL y adicionar ácido fosfórico, llevar a volumen con acetonitrilo.

#### **Preparación madre del estándar:**

- Pesar aproximadamente 2 mg de estándar de referencia de cinarina, transferir a una fiola de 10 mL (200 ppm) y disolver con acetonitrilo; una vez disuelto llevar a volumen.

#### **Preparación del estándar:**

- Tomar una alícuota de 47  $\mu$ L de la solución madre del estándar en una fiola de 5 mL mezclar con fase móvil proporción (60:40) llevar a volumen con fase móvil; filtrar con filtro de membrana de tamaño de poro 0.45  $\mu$ m, inyectar al HPLC.

#### **Sistema de gradiente:**

Durante el análisis fue necesario realizar una serie de pruebas, para así optimizar la gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos. Se utilizó un sistema de gradiente con una fase móvil "A" (0.004% de ácido fosfórico en acetonitrilo) y fase móvil "B" (0.004% de ácido fosfórico en agua) a una velocidad de flujo de 2 mL/min.

En la Tabla N°1 se observa las diferentes proporciones por las cuales pasa nuestra gradiente; donde los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo.

**Tabla N° 1: Condiciones del Sistema de Gradiente**

Tiempo (minutos)	% Fase móvil A	% Fase móvil B	Flujo mL/min
0	5	95	2.0
4	50	50	2.0
4.5	75	25	2.0
4.6	100	0	2.0
7	100	0	2.0
7.1	5	95	2.0
8	5	95	2.0

**Fuente: Elaboración Propia**

## 5. VALIDACIÓN

De acuerdo a criterios mencionados sobre los requerimientos de una validación, se evaluaron los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión, exactitud; los criterios de aceptación en resumen se muestran a continuación en la Tabla N°2.

**Tabla N° 2: Parámetros evaluados en la validación**

<b>Criterios de aceptación</b>	
<b>Selectividad</b>	Identificación del análito sin interferencia
<b>Linealidad</b>	Coefficiente de correlación no menos de 0,995 para valoraciones
<b>Precisión</b>	
-Repetibilidad	DSR no más de 2,0% para valoración de formas farmacéuticas.
-Precisión Intermedia	DSR no más de 3,0% para valoración de formas farmacéuticas.
<b>Exactitud</b>	Recuperación de 98,0%-102,0% para valoración de fármacos y formas farmacéuticas.

**Fuente: Elaboración Propia**

### 5.1. SELECTIVIDAD

Este parámetro nos ayuda a demostrar que el método propuesto dará una señal medible por el análito en presencia de sustancias químicas que puedan alterar su identificación.

- **Hidrólisis acida**

Tomar 47  $\mu\text{L}$  de la solución madre del estándar y llevarla a una fiola de 5 mL luego adicionar 47  $\mu\text{L}$  de Ácido clorhídrico 0.1N someter a baño maría por 1 hora a 60°C.

- **Hidrólisis alcalina**

Tomar 47  $\mu\text{L}$  de la solución madre del estándar y llevarla a una fiola de 5 mL luego adicionar 47  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio 0.1N someter a baño maría por 1 hora a 60°C.

- **Oxidación**

Tomar 47  $\mu\text{L}$  de la solución madre del estándar y llevarla a una fiola de 5 mL luego adicionar 47  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogeno al 3% someter a baño maría por 1 hora a 60°C.

- **Termólisis**

Tomar 47  $\mu\text{L}$  de la solución madre del estándar y llevar a calentamiento a 105°C en baño maría por 1 hora.

## 5.2. LINEALIDAD

El estudio de este parámetro nos permite determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta demostrando la capacidad del método de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del principio activo.

### Preparación:

- Se parte de la solución madre del estándar donde se toman 5 alícuotas diferentes 23  $\mu\text{L}$ , 47  $\mu\text{L}$ , 94  $\mu\text{L}$ , 141  $\mu\text{L}$  y 188  $\mu\text{L}$ , cada alícuota se llevó a fiola de 5 mL, se enraso con fase móvil para así obtener concentraciones de 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm y 8 ppm respectivamente. Tabla N° 3

- Esta operación se realizó por triplicado para evaluar los estimadores de regresión (coeficiente de regresión lineal, pendiente e intercepto de las curvas de calibración).

**Tabla N° 3: Curva de calibración**

<b>Preparación de la curva de validación</b>		
<b>Volumen tomado</b>	<b>Volumen final</b>	<b>Concentración estimada</b>
23 µL	5 mL	1 ppm
47 µL	5 mL	2 ppm
94 µL	5 mL	4 ppm
141 µL	5 mL	6 ppm
188 µL	5 mL	8 ppm

**Fuente: Elaboración Propia**

El estudio de este parámetro no solo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una evaluación estadística. Para realizar esta comprobación se aplicó las siguientes formulas.

- Ecuación de la recta:

$$Y = bX \pm a$$

Donde X : Concentración  
 Y : Respuesta  
 b : Valor de la pendiente  
 a : Terminio independiente

- Pendiente b:

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

- Ordenada de origen a:

$$a = \frac{\sum Y - b \sum X}{n}$$

- Coeficiente de correlación(r):

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}}$$

En la recta de regresión la pendiente b se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que mayor pendiente mayor sensibilidad; la ordenada de origen a es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático.

El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable X (concentración) y la variable Y (respuesta); el valor recomendable para el coeficiente de correlación es mayor igual a 0.999.

### 5.3. PRECISIÓN

Este parámetro expresa la medida de dispersión alrededor de un valor medio, entre una serie de medidas múltiples de alícuotas a partir de una muestra.

**Preparación:**

- **Repetibilidad del sistema instrumental:** Para la determinación de este parámetro se preparó una solución estándar, tomando una alícuota de 47  $\mu\text{L}$  en una fiola de 5 mL a partir de la solución estándar madre, cuya concentración es equivalente a 2 ppm, la solución fue preparada el mismo día, se enraso con fase móvil y se inyectó en el equipo HPLC 6 veces.

Este parámetro se expresa matemáticamente como la desviación estándar, estimada analíticamente por  $s$ .

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde  $n$  : Numero de medidas

$\bar{x}$  : Valor medio en el ensayo y el estimador de la medida poblacional, calculando como:

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

- **Repetibilidad del método:** Se evaluaron 6 preparaciones a partir de una muestra homogénea, la preparación se desarrolló según lo mencionado en el Capítulo II acápite 3.2.; este procedimiento se realizó por un mismo analista, día e instrumentó.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Donde  $S$  : Desviación Estándar

$X$  : Media aritmética de los resultados

- **Precisión intermedia:** El objetivo de este estudio es determinar la variabilidad del método, donde la preparación de la muestra se desarrolló en condiciones diferentes (analista, día), siguiendo el mismo procedimiento propuesto en el Capítulo II acápite 3.2.

Esta operación se realizó con la preparación de muestras en días la determinación del coeficiente de variación y la desviación estándar relativa.

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde  $n$  : Número de medidas,

$x_i$  : Valor medio en el ensayo y el estimador de la medida poblacional, calculando como:

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

Desviación estándar relativa:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

Donde  $s$  : Desviación Estándar

$X$  : Media aritmética de los resultados

#### 5.4. EXACTITUD

La exactitud es el parámetro que mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero. La exactitud se expresa mediante el porcentaje de recuperación dada por la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida.

Este parámetro se expresa mediante el porcentaje de recuperación el cual se determinó mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de Recuperación (R)} = \frac{[M.E.] - [M]}{[St]} * 100$$

Donde

M.E	:	Concentración muestra enriquecida
M	:	Concentración Muestra
St	:	Concentración del estándar

#### **Preparación:**

Para el desarrollo de este parámetro se procedió a elaborar tres tipos de soluciones las cuales independientemente cada una debe contener lo siguiente:

- **Preparación de la solución estándar:**

Preparar una solución equivalente a 2 ppm a partir de la solución madre del estándar, desarrollar el procedimiento descrito en el Capítulo II acápite 3.2. Filtrar e inyectar al HPLC.

- **Preparación de la solución muestra:**

Pesar el equivalente a 100 mg de la muestra y desarrollar el procedimiento descrito en el Capítulo II acápite 3.2. Filtrar e inyectar al HPLC.

- **Preparación de la solución muestra enriquecida:**

Pesar el equivalente a 100 mg de la muestra, adicionar 47  $\mu$ L de la solución estándar madre para enriquecer y desarrollar el procedimiento descrito en el Capítulo II acápite 3.2. Filtrar e inyectar al HPLC.

## 6. ANALISIS DE MUESTRAS COMERCIALIZADAS

Una vez validado el método y observar que cumple con los parámetros descritos se procedió a analizar las muestras obtenidas, para esto se comenzó a evaluar algunos criterios que deberían cumplir los productos comercializados, entre estos son la identificación de lote, laboratorio de elaboración, etiquetado, condición de almacenamiento, fecha de vencimiento.

## CAPÍTULO III

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La finalidad de este trabajo es proporcionar una técnica que permita evaluar el contenido de cinarina en productos comerciales de alcachofa y otras muestras que pudieran contener este ingrediente activo, para la determinación cuantitativa de cinarina se propone validar un método analítico por HPLC; además de realizar una búsqueda bibliográfica que permitiera enriquecer la metodología propuesta.

Se trabajó a una longitud de onda de 330 nm, óptima para la detección del análisis de interés,<sup>16, 24, 32, 33</sup> a esta longitud de onda se determinó el máximo de absorbancia; se utilizó una fase estacionaria, RP-18 octadecilsilano unido químicamente a micropartículas de sílice, diseñada para cromatografía en fase reversa; la elección del disolvente se basa en la solubilidad y polaridad de la molécula “lo semejante disuelve lo semejante”, para la extracción se consideró la cantidad de solvente a utilizar y la complejidad del análisis.

## 1. PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

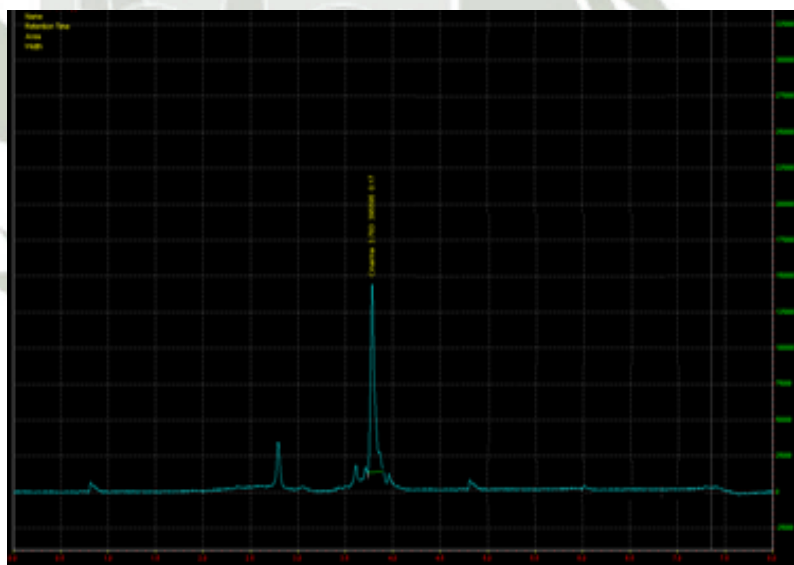
Se evaluaron los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión y exactitud.

### 1.1. SELECTIVIDAD

La determinación de la selectividad es una tarea complicada ya que en muchos casos no existen muchos patrones de referencia y métodos descritos en farmacopeas para el control de calidad y se limitan a valorar el contenido.

#### 1.1.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Al someter nuestro estándar a calentamiento por una hora a 60°C, con ácido clorhídrico se puede observar que hay una pequeña degradación, Figura N°6, pero no se detecta ninguna respuesta significativa en el tiempo de retención.



**Figura N°6: Cromatograma de cinarina sometida a hidrólisis ácida**

### 1.1.2. HIDRÓLISIS ALCALINA

Al someter nuestro estándar a calentamiento por una hora a 60°C, con hidróxido de sodio, Figura N°7, se puede observar que hay una pequeña degradación pero no se detecta ninguna respuesta significativa en el tiempo de retención.

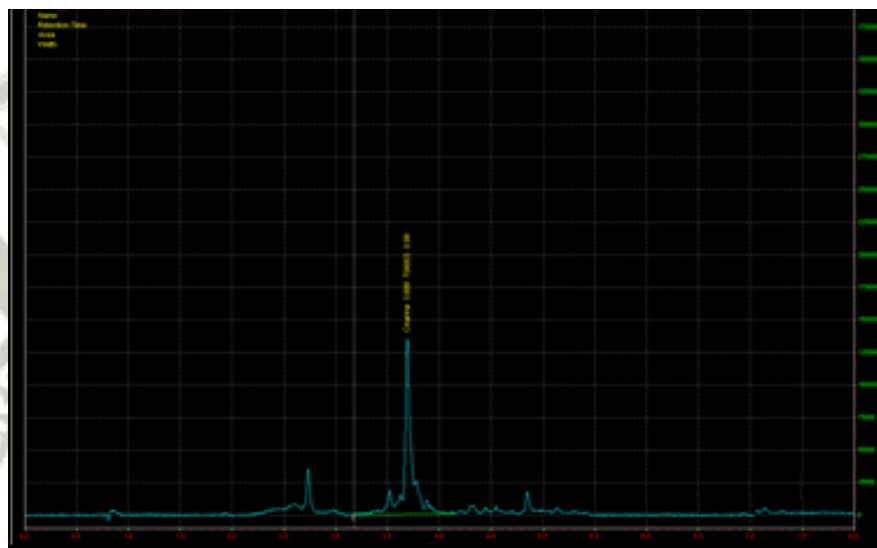
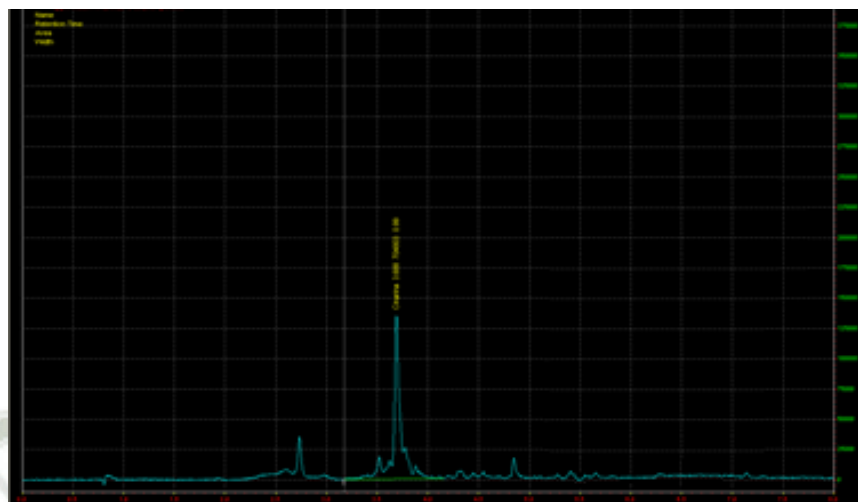


Figura N°7: Cromatograma de cinarina sometida a hidrólisis alcalina

### 1.1.3. OXIDACIÓN

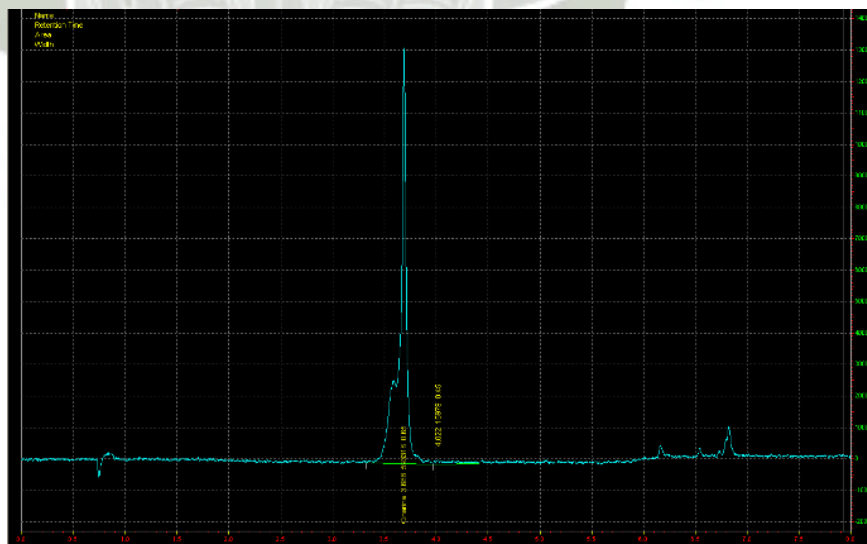
Al someter nuestro estándar a calentamiento por una hora a 60°C, con peróxido de hidrogeno, Figura 8, se puede observar que hay una pequeña degradación pero no se detecta ninguna respuesta significativa en el tiempo de retención.



**Figura N°8: Cromatograma de cinarina sometida a oxidación**

#### 1.1.4. TERMÓLISIS

Al someter nuestro estándar a calentamiento por una hora a 105°C, Figura N°9, se puede observar que hay una degradación pero no se detecta ninguna respuesta significativa en el tiempo de retención.



**Figura N°9: Cromatograma de cinarina sometida a termólisis**

## 1.2. LINEALIDAD

Este paso de la validación se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de análito y su respuesta.

Para el desarrollo de este parámetro se trabajan 5 niveles de concentración 1, 2, 4, 6, 8 ppm, preparadas a partir de la solución estándar madre, dichas soluciones se analizaron por triplicado, resultado de ello un total de 15 determinaciones.

La Tabla N° 4 muestra la desviación estándar relativa para cada grupo; los resultados obtenidos serán utilizados para elaborar la curva de calibración y efectuar el test estadístico relacionado con la linealidad.

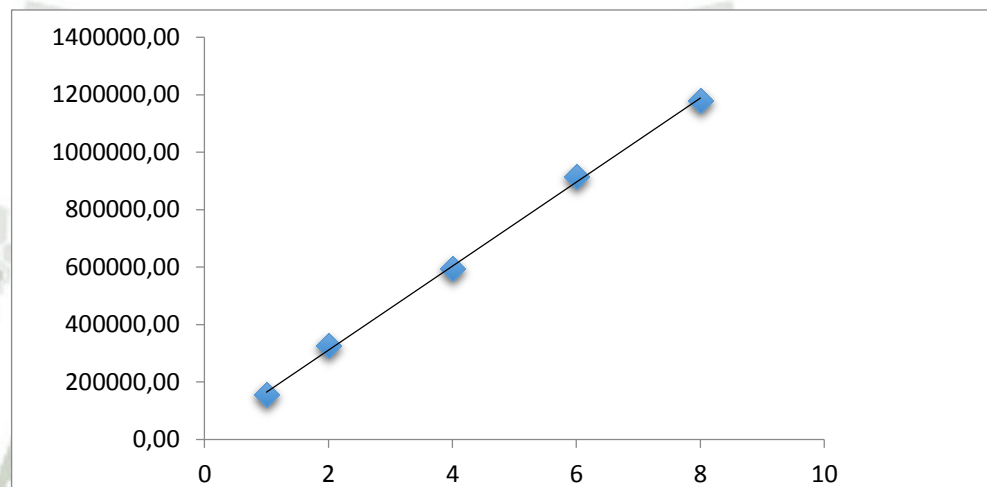


**Tabla N°4: Resultado de la linealidad del sistema cinarina**

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ppm (x)</b>	<b>Área (y)</b>	<b>x.y</b>	<b>x2</b>	<b>y2</b>	<b>Factor de Respuesta(y/x)</b>	<b>Varianza</b>
M1	1	168389	168389	1	28354855321	168389	8.048
M2	1	148061	148061	1	21922059721	148061	
M3	1	145910	145910	1	21289728100	145910	
M1	2	344060	688120	4	118377283600	172030	6.614
M2	2	329056	658112	4	108277851136	164528	
M3	2	301674	603348	4	91007202276	150837	
M1	4	609292	2437168	16	371236741264	152323	2.878
M2	4	593057	2372228	16	351716605249	148264.25	
M3	4	575198	2300792	16	330852739204	143799.5	
M1	6	919992	5519952	36	846385280064	153332	0.856
M2	6	915796	5494776	36	838682313616	152632.667	
M3	6	904849	5429094	36	818751712801	150808.167	
M1	8	1178329	9426632	64	1388459232241	147291.125	0.062
M2	8	1179719	9437752	64	1391736918961	147464.875	
M3	8	1179414	9435312	64	1391017383396	147426.75	
<b>Sumatoria</b>	15	63	9492796	363	8118067906950	2293097.3	18.459

**Fuente: Elaboración propia**

La Figura N°10, muestra la curva de calibración representada gráficamente, los resultados del estudio relacionan las concentraciones “x” (variable independiente) y la respuesta “y” (variable dependiente), donde la regresión lineal es, un indicador de la linealidad del método; esta representación gráfica evidencia la relación lineal existente entre la concentración versus área.



**Figura N°10: Curva de calibración para cinarina**

- **Ecuación de la recta:**

$$Y = 146299.83 X + 18393.80$$

- **Ordenada de origen a:**

$$a = 146299.83$$

- **Pendiente b:**

$$b = 18393.8$$

La información obtenida mediante el cálculo de “r” es limitada y no justifica por si sola la linealidad, siendo “r<sup>2</sup>” coeficiente de determinación el que

aporta una mayor significación estadística. El método de mínimos cuadrados permite estimar los parámetros de la relación.

En la Tabla N°5, se observa que el coeficiente de correlación “r” es de 0.999 este resultado indica que existe un alto grado de correlación entre la concentración (variable independiente) y el área respuesta (variable dependiente); el coeficiente de determinación “r<sup>2</sup>” es de 0.998 este resultado nos indica que el 99% de la variación entre las áreas puede ser explicada por la variación de la concentración. El r<sup>2</sup> ajustado es una corrección a la baja de r<sup>2</sup>, en nuestro caso el valor de r<sup>2</sup> corregido es igual a r<sup>2</sup>, el error típico representa una medida de la parte de variabilidad de la variable dependiente que no es explicada por la recta de regresión, en nuestro análisis este error típico es pequeño de 0.126 lo que indicaría que hay un buen ajuste.

**Tabla N°5: Estadística de la regresión para determinación de la linealidad**

Resumen del modelo									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Estadísticas de cambios				
					Cambio de cuadrado de R	Cambio en F	df1	df2	Sig. Cambio en F
1	0,999 <sup>a</sup>	0,998	0,998	0,126	0,998	6,215,863	1	13	0,000

a. Predictores: (Constante), variable y

**Fuente: Elaboración Propia**

Se realizó un test estadístico del coeficiente de correlación para indicar si el modelo es lineal o no, comparando así el t de regresión, frente a un t tablas con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% valor que es

encontrado en la tabla de distribución de t de student, para el análisis se plantearon dos hipótesis:

Hipótesis nula ( $H_0$ ): no existe correlación significativa entre x y y  $r=0$

Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): r no debe ser significativamente diferente de uno.

El t de regresión fue calculado a partir de la siguiente formula:

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

Al aplicar la formula se obtuvo un  $t_r$  de 180.25 mayor al t tablas de 2.160 cumpliendo así con el test de student, rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa, se puede concluir que si hay correlación significativa entre las concentraciones y sus áreas.

El valor obtenido indica que la probabilidad de que b sea diferente de 0 sea muy elevada. Si b fuera igual a 0 esto significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.

### 1.3. PRECISIÓN

Este parámetro se determinó mediante el estudio de la repetibilidad tanto del sistema como del método y la precisión intermedia.

#### 1.3.1. REPETIBILIDAD

Se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación de una serie de medidas.

- **Repetibilidad del sistema instrumental**

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, se determina evaluando la dispersión de una serie de medidas a partir de una muestra homogénea; <sup>29</sup> la estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo del coeficiente de variaciones de las respuestas obtenidas.

**Tabla N° 6: Repetibilidad del sistema**

Numero de inyección	Estándar cinarina			
	Concentración esperada	Área	Tiempo de retención (min)	Concentración hallada(ppm)
1	2 ppm	325007	3.73	2.10
2	2 ppm	320666	3.73	2.07
3	2 ppm	325283	3.74	2.10
4	2 ppm	327319	3.74	2.11
5	2 ppm	323969	3.74	2.09
6	2 ppm	323319	3.74	2.08
7	2 ppm	330170	3.74	2.13
8	2 ppm	330343	3.78	2.13
	Promedio	325759.5	3.74	2.10
	S	3354.996	0.016	0.023
	RSD	1.030	0.422	1.092

**Fuente: Elaboración Propia**

Se realizó una serie de medidas a partir de la preparación de un estándar de 2 ppm, para así determinar el grado concordancia entre ellas. En la Tabla N° 6, se puede observar la RSD tanto para las áreas y tiempos de retención menores de 2% los cuales son aceptados por la

USP 37, <sup>28</sup> por lo que podemos afirmar que la precisión del sistema es adecuada.

- **Repetibilidad del método**

La estimación de la repetibilidad del método se realiza tanto con el cálculo del coeficiente de variación y con el intervalo de confianza, <sup>29</sup> este ensayo se efectúa sobre una serie de alícuotas dadas por el mismo instrumento y mismo analista.

**Tabla N° 7: Repetibilidad del método**

Numero de inyección	Muestra		
	Peso (g)	Área	Concentración hallada de cinarina (ppm)
1	0.1023	496135	3.27
2	0.1037	492142	3.24
3	0.1028	486486	3.2
4	0.1067	502431	3.31
5	0.1059	494469	3.25
6	0.1035	496825	3.27
PROMEDIO		494748	3.26
S		5814.19	0.04
RSD		1.18	1.22

**Fuente: Elaboración Propia**

Las muestras se prepararon a partir del polvo de alcachofa, este procedimiento se realizó 6 veces obteniendo, como respuesta las áreas

que se muestran en la Tabla N° 7; el RSD obtenido en este parámetro es aceptable, ya que la USP indica valores mayores al 2% fuera de especificación.<sup>28</sup>

Para la determinación del intervalo de confianza se desarrolló la siguiente formula:

$$I.C. = \bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Dónde  $\bar{x}$  : Media de una serie de resultado obtenidos en un mismo nivel de concentración

t : Valor de t de student de tablas para n-1 grados de libertad y un grado de confianza del 95 %

n : Número de muestras

s : Desviación estándar

El intervalo de confianza obtenido fue 3.22 - 3.29 ppm siendo nuestro resultado conforme por encontrarse dentro de las especificaciones.

### 1.3.2. PRECISIÓN INTERMEDIA

En esta prueba los resultados fueron obtenidos a partir del análisis realizado por el analista A y analista B en dos días diferentes; se prepararon 12 muestras 6 por cada analista; en la Tabla N° 8 se puede observar tanto las áreas, como las concentraciones para cada muestra y una desviación estándar relativa total de 1.05%, considerada aceptable para un estudio de precisión intermedia valores de desviación estándar menores al 3%.<sup>29</sup>

**Tabla N° 8: Precisión intermedia**

Numero de inyección	Analista A		Analista B	
	Área	Concentración cinarina (ppm)	Área	Concentración cinarina (ppm)
1	496135	3.27	498114	3.28
2	492142	3.24	492135	3.24
3	486486	3.2	485480	3.19
4	502431	3.31	500490	3.3
5	494469	3.25	493904	3.25
6	496825	3.27	493976	3.25
<b>Promedio</b>	494748	3.26	494016.5	3.25
<b>S</b>	5814.19	0.04	5812.05	0.04
<b>RSD</b>	1.18	1.22	1.18	1.22
<b>Promedio total</b>				3.25
<b>Desviación estándar total</b>				0.03
<b>Desviación estándar relativa total</b>				1.05

**Fuente: Elaboración Propia**

#### 1.4. EXACTITUD:

La exactitud es el parámetro que indica, que tan próximo se encuentra el valor medido al valor verdadero, este parámetro se expresa mediante el porcentaje de recuperación.<sup>32</sup>

Para la determinación de este parámetro se preparó un total de 15 soluciones a analizar (solución estándar (St), muestra (M) y muestra enriquecida (ME)) los resultados se muestran en la Tabla N° 9, además se expresa la exactitud como porcentaje de recuperación (%R)

**Tabla N° 9: Porcentaje de recuperación**

	Área			Concentración (ppm)			% R
	St	M	ME	St	M	ME	
<b>1</b>	306899	470001	763459	1.97	3.09	5.09	102
<b>2</b>	294288	468213	738416	1.89	3.07	4.92	98
<b>3</b>	305916	475458	764435	1.97	3.12	5.1	101
<b>4</b>	308296	464962	749042	1.98	3.05	4.99	98
<b>5</b>	300951	472985	745434	1.93	3.11	4.97	96
$\bar{x}$	303270	470323.8	752157.2	1.95	3.09	5.02	99
<b>S</b>	5733.36	4085.05	11425.86	0.04	0.03	0.08	2.14
<b>DSR</b>	1.89	0.87	1.52	2.01	0.9	1.56	2.17

**Fuente: Elaboración Propia**

De los resultados obtenidos en la Tabla N° 10 se obtiene que el promedio del porcentaje de recuperación es de 99% este valor se encuentra dentro de los criterios de aceptación 98% a 102% ,<sup>28</sup> para confirmar que nuestro resultado no difiere significativamente, se prosiguió a evaluar por medio de un test estadístico, donde se compara un t experimental con un t de tablas para n-1 grados de libertad y p= 0.05.

$$t_{exp} = \frac{[100 - R]\sqrt{n}}{RSD}$$

Donde: R : Recuperación Porcentual  
n : Numero de Análisis  
RSD : Desviación Estándar Relativa

Al aplicar el análisis estadístico t de student se obtuvo como resultado un valor de t experimental igual a 1.12 y encontrándose como valor t tabla 2.78; siendo el t experimental menor al t tablas podemos afirmar que el método analítico propuesto es exacto.

## 2. ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALIZADAS

Los medicamentos fitoquímicos aportan beneficios específicos sobre la salud y en particular la mayoría posee propiedades antioxidantes que protegen frente a los efectos del envejecimiento y de algunas enfermedades crónicas, la alcachofa al poseer en su composición derivados de ácidos fenólicos, flavonoide entre otros es uno de los vegetales de los cuales se desarrollaron diferentes formas farmacéuticas, la mayoría de estos productos, no son fiscalizados, no se conocen bien sus bases moleculares ni sus interacciones con otros componentes dietéticos.

La alcachofa en el mercado peruano presenta 4 diferentes formas farmacéuticas registradas por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) las cuales son la harina de alcachofa, bebida a base de alcachofa, conserva de alcachofa y extracto de alcachofa en capsulas, la última fue elegida por la demanda que presenta en el mercado, siendo esta presentación insípida y que permiten, por tanto, enmascarar características organolépticas desagradables del principio activo, como un sabor amargo o un olor.

La determinación del contenido de cinarina se realizó siguiendo el procedimiento del método analítico propuesto, este procedimiento fue aplicado a 6 diferentes productos.

**Tabla N° 10: Características Organolépticas Presentes**

**Presencia de polvo en el envase**



**Presencia de polvo en cápsulas**



**Cápsulas en mal estado**



**Cápsulas con menor presencia de  
contenido**



**Cápsulas rotas**



**Fuente Elaboración Propia**

El procedimiento que realizan las industrias en la elaboración de capsulas se basa en el llenado por acción de la gravedad, se tapa, se pule o limpia. Para el llenado de cápsulas generalmente se emplean cuatro métodos manual, semimanual, semiautomático y automático.

Algunas características organolépticas que presentaron 4 de los productos seleccionados en sus diferentes muestras, se presentan en las imágenes de la Tabla N° 10; donde se observa parte del contenido de las cápsulas en el envase, presencia de polvo perteneciente al extracto de alcachofa, llenado no uniforme del contenido presentando variación en el peso y capsulas rotas probablemente debido a las variaciones de tanto de temperatura y humedad en el almacenamiento de la materia prima. Las desventajas que presentan estas formas farmacéuticas se pudieron observar al comenzar nuestro análisis cuantitativo.

La identificación previa al análisis cuantitativo, fue mediante la comparación del tiempo de retención de la muestra en el análisis cromatográfico frente al tiempo de retención de un patrón; los tiempos de retención obtenidos en las diferentes muestras fue de tres minutos siete segundos aproximadamente, siendo el mismo.

Los resultados de la concentración de cinarina de los diferentes productos son detallados en las Tablas N° 11,12,13,14,15,16 que se presentaran a continuación, el cálculo de las concentraciones fueron realizadas tomando como relación la concentración de estándar conocida y el área del pico de cada muestra.

En la Tabla N°11 se muestra los resultados del Producto “A”; con los siguientes datos; pesos tomados, tiempos de retención y áreas correspondientes. De este producto se pudo obtener 3 diferentes lotes de la misma industria farmacéutica, a los que se analizó 4 veces, con un total de 12 inyecciones, el promedio para cada lote fue de 25.098, 24.740 y 24.853 mg/cap.

**Tabla N° 11: Resultado mg/cap. de cinarina del producto A**

Producto A								
Muestra	Peso (g)	Área	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	Concentración (mg/cap.)	Promedio mg/cap.	Desviación estándar	Desviación estándar relativa
Lote A1	1	0.0786	592852	3.72	3.927	24.978	25.098	0.173
	2	0.0784	599156	3.71	3.970	25.317		
	3	0.0788	593466	3.72	3.931	24.941		
	4	0.0783	594712	3.71	3.939	25.155		
Lote A2	1	0.0787	582864	3.74	3.858	24.513	24.740	0.320
	2	0.0793	593749	3.74	3.933	24.796		
	3	0.0773	587707	3.73	3.891	25.171		
	4	0.0785	580682	3.73	3.843	24.480		
Lote A3	1	0.0786	584086	3.73	3.867	24.597	24.853	0.198
	2	0.0794	595537	3.73	3.945	24.842		
	3	0.0788	592407	3.74	3.924	24.896		
	4	0.0783	592945	3.74	3.927	25.078		

**Fuente: Elaboración Propia**

Una vez obtenido el resultado del contenido de cinarina se procedió a evaluar estadísticamente; uno de los criterios a evaluar fue la RSD, obteniendo para los lotes del producto A; lote A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub> un RSD de 0.690, 1.295 y 0.798% respectivamente, estos valores muestran la homogeneidad presente en el grupo debido a que el criterio de aceptación es no mayor al 2%, seguidamente se opta por realizar un ANOVA.

La Tabla N°12 muestra la prueba F de Fisher donde se obtiene un F calculado de 2.334 menor al F tablas indicando que no existe diferencia significativa, corroborado por el test de probabilidad 0.153 mayor a 0.05.

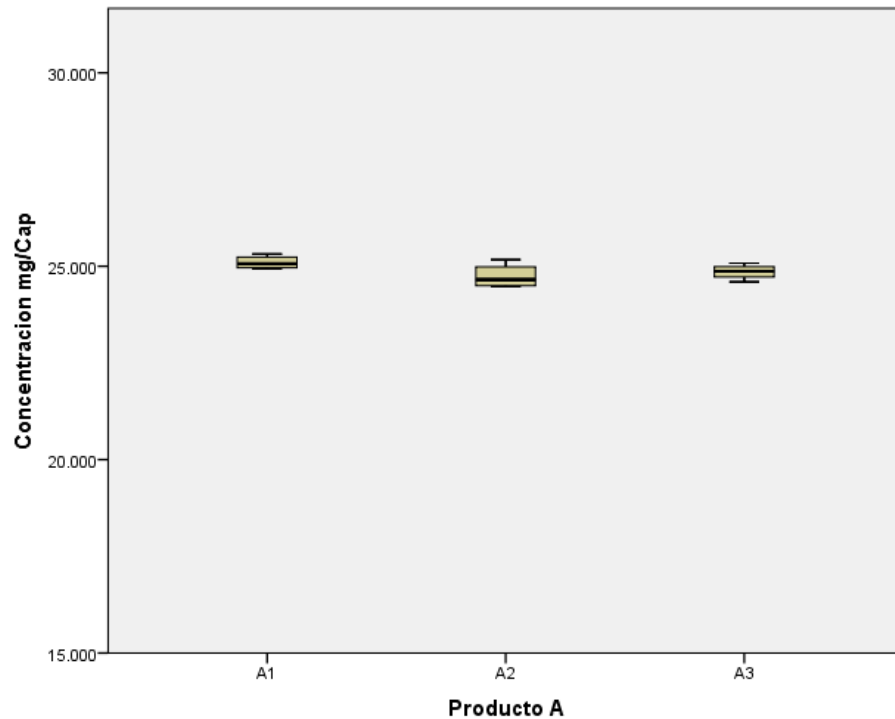
**Tabla N°12 Tabla ANOVA para producto A**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados libertad</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	0.268	2	0.134	2.33 4	0.153
<b>Dentro de los grupos</b>	0.516	9	0.057		
<b>Total</b>	0.784	11			

**F**

**Fuente: Elaboración propia**

En la Figura N°11 se muestra gráficamente la dispersión de los datos para cada lote, el valor mínimo para este producto fue de 24.480 mg/cap. y el valor máximo fue de 25.317 mg/cap., hay semejanza en relación a los tres lotes A1, A2 y A3.



**Figura N°11: Diagrama de cajas y bigotes del producto A**

En la Tabla N°13 se presenta el producto “B” las áreas, los tiempos de retención y las concentraciones halladas para este producto durante su análisis organoléptico presento capsulas con pesos variados y a la vez en el interior del envase presencia de polvo; un resultado a evaluar en esta tabla fueron las desviaciones estándar obtenidas en los cada lote, el lote B<sub>2</sub> tiene una desviación estándar mayor al 2% valor que se encuentra fuera a la especificación cuantitativa según la USP.

En los lotes B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> las desviaciones estándar relativas se encuentran dentro de las especificaciones establecidas pero sin embargo el lote B<sub>1</sub> se encuentra con un valor cercano al límite establecido, al comparar el RSD podríamos decir que hay similitud entre estas, pero con poca evidencia para indicar que no son iguales.

**Tabla N° 13: Resultado mg/cap. de cinarina del producto B**

Producto B									
Muestra	Peso (g)	Área	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	Concentración (mg/cap.)	Promedio mg/cap.	Desviación estándar	Desviación estándar relativa	
Lote B 1	1	0.1097	445985	3.74	2.923	13.321	13.706	0.257	1.875
	2	0.1083	456578	3.74	2.995	13.828			
	3	0.1081	456687	3.73	2.996	13.857			
	4	0.109	459105	3.74	3.012	13.818			
Lote B 2	1	0.1086	526035	3.73	3.470	15.975	15.646	0.350	2.234
	2	0.1087	511385	3.73	3.370	15.500			
	3	0.1088	503014	3.74	3.313	15.223			
	4	0.1083	521812	3.75	3.441	15.886			
Lote B 3	1	0.1085	459714	3.74	3.017	13.901	14.075	0.190	1.348
	2	0.1092	468319	3.74	3.075	14.081			
	3	0.1079	459758	3.77	3.017	13.980			
	4	0.1083	472717	3.74	3.105	14.337			

**Fuente Elaboración Propia**

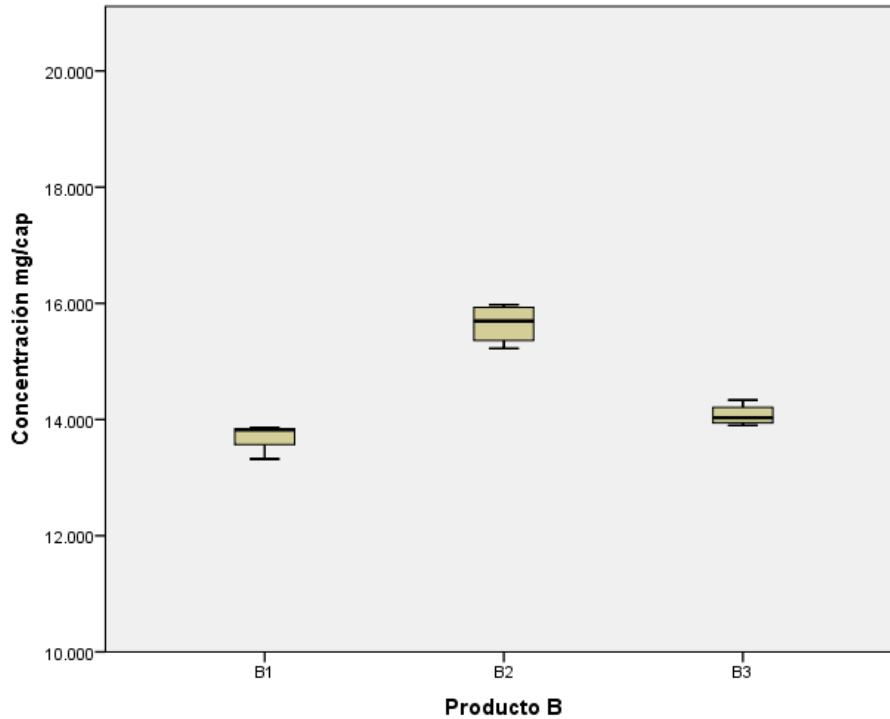
En la Tabla N°14 se observa el análisis ANOVA para el producto B, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 56.802 mayor al F tablas indicando así la diferencia existente en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así la diferencia estadísticamente significativa en este producto.

**Tabla N°14 Tabla ANOVA para producto B**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	8.493	2	4.246	56.802	7.87E-06
<b>Dentro de los grupos</b>	0.673	9	0.075		
<b>Total</b>	9.165	11			

**Fuente: Elaboración propia**

En la Figura N°12 se detalla gráficamente el resultado promedio de los lotes B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> teniendo como valor mínimo de este producto la concentración de 13.321 mg/cap. y valor máximo hallado la concentración de 15.975 mg/cap.; en la gráfica se observa además la relación que existe entre la mediana del lote B<sub>1</sub> y B<sub>3</sub> mientras que en el lote B<sub>2</sub> aproximadamente el 75% tiene una predisposición para valores inferiores a su mediana.



**Figura N°12: Diagrama de cajas y bigotes del producto B**

En la Tabla N°15 se muestra los resultados del producto “C” con los siguientes datos: pesos tomados, tiempos de retención y áreas correspondientes. De este producto se pudo obtener 2 diferentes lotes ( $C_1$  y  $C_2$ ) de la misma industria farmacéutica, a los que se analizó 4 veces con un total de 8 análisis, el resultado promedio del contenido fue de 21.904 y 16.539 mg/cap. para el lote  $C_1$  y  $C_2$ , este producto en su análisis organoléptico presentó algunos pesos variados por debajo de su peso promedio.

En los lotes  $C_1$  y  $C_2$  las desviaciones estándar relativas se encuentran dentro de las especificaciones establecidas 0.596 y 1.508%, al comparar el RSD podríamos decir que hay similitud entre estas pero se tendrá poca evidencia para indicar que no son iguales, es por ello que se realizara un análisis estadístico ANOVA y un esquema de caja y bigotes para evidenciar la variación entre estos lotes.

**Tabla N° 15: Resultado mg/cap. de cinarina del producto C**

Producto C								
Muestra	Peso (g)	Área	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	Concentración (mg/cap.)	Promedio mg/cap.	Desviación estándar	Desviación estándar relativa
Lote C 1	1	0.1097	716685	3.75	4.773	21.904	0.130	0.596
	2	0.1083	717578	3.75	4.779			
	3	0.1081	709792	3.75	4.726			
	4	0.1090	718058	3.76	4.782			
Lote C 2	1	0.1085	547649	3.76	3.618	16.539	0.249	1.508
	2	0.1092	542782	3.75	3.584			
	3	0.1079	531765	3.76	3.509			
	4	0.1083	551191	3.75	3.642			

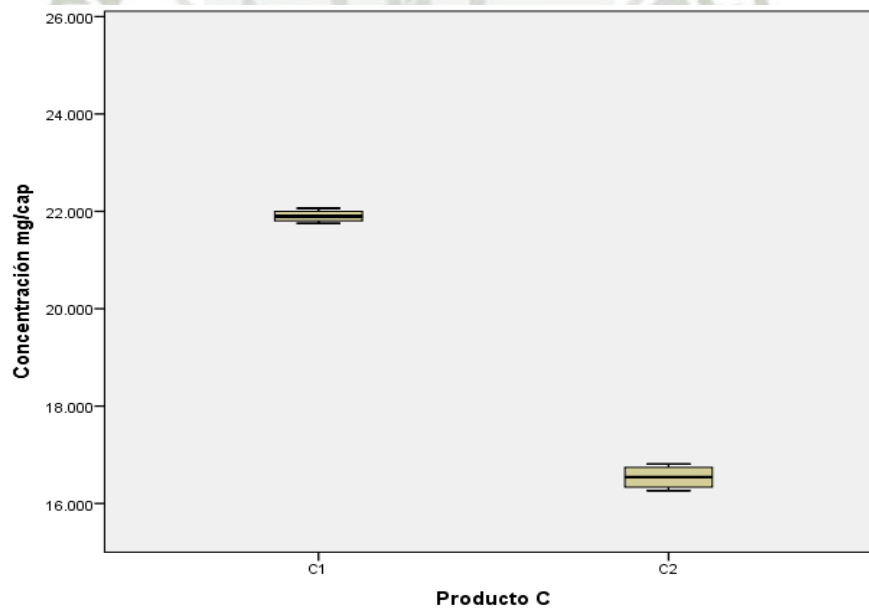
**Fuente: Elaboración Propia**

En la Tabla N°16 se observa el análisis ANOVA para el producto C, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 1453.604 mayor al F tablas indicando así la diferencia existente en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así la diferencia estadísticamente significativa en este producto.

**Tabla N°16 Tabla ANOVA para producto C**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	57.559	1	57.559	1453.604	2.174E-08
<b>Dentro de los grupos</b>	0.238	6	0.040		
<b>Total</b>	57.797	7			

**Fuente: Elaboración Propia**

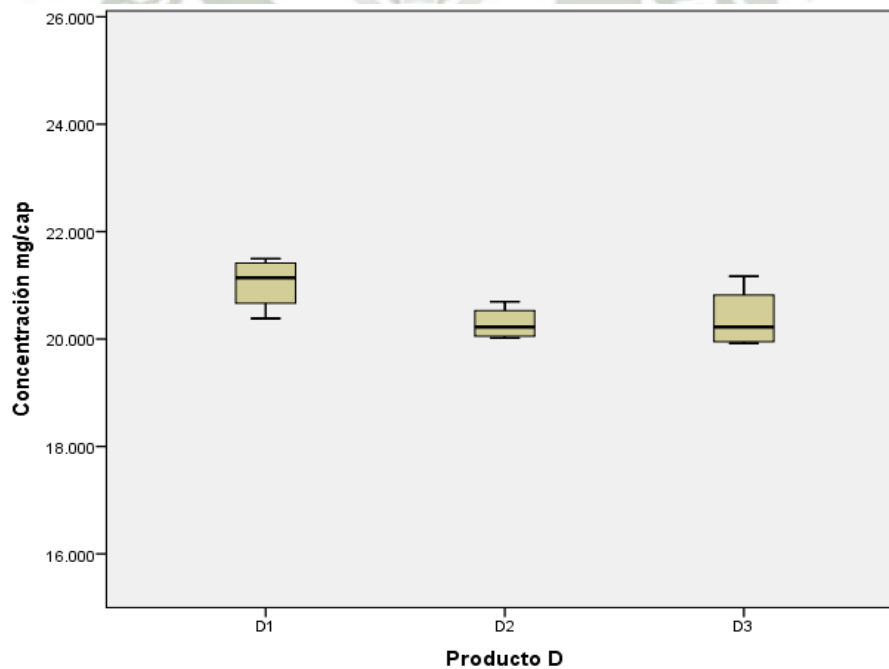


**Figura N°13: Diagrama de cajas y bigotes del producto C**

En la Figura N°13 gráficamente se observa, que en el lote C1 no hay una dispersión significativa con relación a su mediana obtenida en el análisis, el lote C2 muestra también una mínima variabilidad, no obstante al observar los datos obtenidos de los dos grupos de estudio se infiere que no hay relación entre estos dos lotes.

Al realizar el análisis organoléptico del producto “D” se evidencio la presencia de polvo perteneciente al contenido de las capsulas y pesos variados de igual manera que el producto “B” y “C”, además de algunas imperfecciones en las capsulas probablemente originadas durante el envasado y llenado.

La Figura N°14 muestra gráficamente, la dispersión de datos y la relación existente de los tres lotes; además una mayor relación con respecto de sus medias de los lotes D2 y D3, el lote D1 presenta aproximadamente un 75% de inclinación hacia los otros dos productos.



**Figura N°14 Diagrama de cajas y bigotes del producto D**

En la Tabla N°17 se presentan los análisis realizados para los lotes obtenidos D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, cada lote por 4 veces con un total de 12 análisis, además se presentan los respectivos pesos tomados para cada análisis, áreas obtenidas, tiempos de retención, resultado promedio y desviación estándar, los resultados promedios fueron de 21.040, 20.291 y 20.384 mg/cap. respectivamente.



**Tabla N° 17: Resultado mg/cap. de cinarina del producto D**

Producto D									
Muestra	Peso (g)	Área	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	Concentración (mg/cap.)	Promedio mg/cap.	Desviación estándar	Desviación estándar relativa	
Lote D 1	1	0.1012	654897	3.75	4.351	21.495	21.040	0.494	2.349
	2	0.1052	645821	3.74	4.289	20.383			
	3	0.1047	660140	3.74	4.387	20.948			
	4	0.1036	665053	3.74	4.420	21.332			
Lote D 2	1	0.1097	660974	3.74	4.392	20.019	20.291	0.308	1.516
	2	0.1074	668757	3.73	4.445	20.696			
	3	0.1089	667172	3.73	4.435	20.361			
	4	0.1084	655533	3.75	4.355	20.088			
Lote D 3	1	0.1053	633885	3.72	4.207	19.976	20.384	0.578	2.836
	2	0.1057	651493	3.71	4.327	20.470			
	3	0.1097	657813	3.74	4.371	19.921			
	4	0.1095	696612	3.73	4.636	21.168			

**Fuente: Elaboración Propia**

En la Tabla N°18 se observa el análisis ANOVA para el producto D, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 2.971 menor al F tablas indicando así que no existe una diferencia en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad se obtuvo un valor de 0.102 concluyendo así que no existe una la diferencia estadísticamente significativa en este producto.

**Tabla N°18 Tabla ANOVA para producto D**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	1.333	2	0.667	2.971	0.102
<b>Dentro de los grupos</b>	2.019	9	0.224		
<b>Total</b>	3.352	11			

**Fuente Elaboración Propia**

El producto “E” tuvo los lotes E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>, los resultados en sus contenidos fueron de 22.264 y 25.591 mg/cap. respectivamente en la Tabla N° 19 se muestra los análisis realizados así como sus áreas correspondientes; de igual manera que el producto A en su análisis organoléptico tuvo características semejantes tales como el sello de seguridad en el envase, peso promedio homogéneo y un buen estado de las capsulas.

**Tabla N°19: Resultado g/L de cinarina del producto E**

Producto E								
Muestra	Peso (g)	Área	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	Concentración (mg/cap.)	Promedio mg/cap.	Desviación estándar	Desviación estándar relativa
Lote E 1	1	0.1021	705623	3.71	4.697	23.004	22.264	0.693
	2	0.1017	683721	3.71	4.548	22.358		
	3	0.1034	663674	3.73	4.411	21.328		
	4	0.103	692473	3.72	4.608	22.367		
Lote E 2	1	0.1013	770450	3.72	5.141	25.373	25.591	0.488
	2	0.1057	831132	3.72	5.555	26.279		
	3	0.1037	794030	3.72	5.302	25.563		
	4	0.1048	789618	3.73	5.272	25.150		

**Fuente: Elaboración Propia**

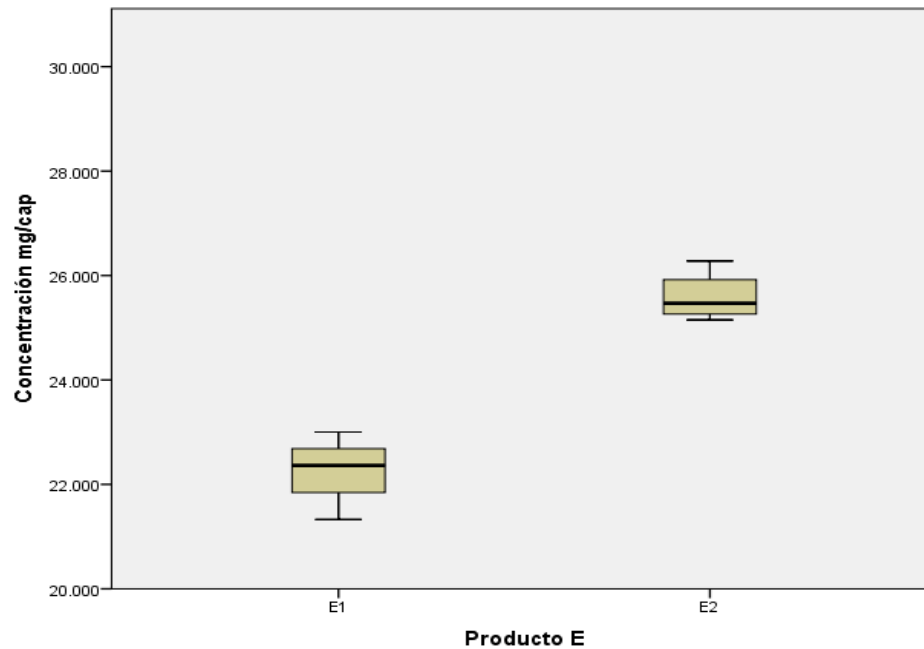
En la Tabla N°20 se observa el análisis ANOVA para el producto E, para este producto en la prueba F de Fisher, se obtuvo un F calculado de 61.545 mayor al F tablas indicando así que existe una diferencia en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así que no existe una la diferencia estadísticamente significativa en este producto.

**Tabla N°20 Tabla ANOVA para producto E**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	22.135	1	22.135	61.545	2.227E-04
<b>Dentro de los grupos</b>	2.158	6	0.360		
<b>Total</b>	24.293	7			

**Fuente: Elaboración propia**

En la Figura N°15 se muestra el grafico de caja y bigotes del producto E, se observa que no hay relación entre el lote E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>, la mediana obtenida en el lote E1 fue de 22.264 mg/cap. mientras que el del lote E<sub>2</sub> fue de 25.591 mg/cap. existiendo una gran variabilidad entre ambos lotes.



**Figura N°15: Diagrama de cajas y bigotes del producto E**

Se analizaron 3 lotes de producto F ( $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_3$ ), con relación al producto de comparación este producto presento en su análisis organoléptico algunas variaciones como no presentar el sello de seguridad, en la Tabla N°21 se presenta los resultados promedio, desviación estándar, tiempo de retención, áreas obtenidas y pesos tomados.

Los resultados promedio de sus contenidos fueron de 22.527, 27.194 y 22.408 mg/cap. para los lotes  $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_3$  respectivamente; en su análisis organoléptico este producto presento el sello de seguridad en el envase, peso promedio homogéneo y un buen estado de las capsulas.

**Tabla 21: Resultado g/L de cinarina del producto F**

Producto F									
Muestra	Peso (g)	Área	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	Concentración mg/cap.	Promedio mg/cap.	Desviación estándar	Desviación estándar relativa	
Lote F 1	1	0.0735	514694	3.77	3.392	23.077	22.527	0.438	1.945
	2	0.0768	522110	3.76	3.443	22.416			
	3	0.0763	522840	3.77	3.448	22.595			
	4	0.075	501637	3.78	3.303	22.021			
Lote F 2	1	0.0729	612021	3.77	4.058	27.830	27.193	0.544	2.002
	2	0.0752	614770	3.76	4.076	27.104			
	3	0.0739	609204	3.76	4.038	27.323			
	4	0.0772	617348	3.76	4.094	26.516			
Lote F 3	1	0.0732	503666	3.77	3.317	22.657	22.408	0.709	3.166
	2	0.0715	500735	3.77	3.297	23.055			
	3	0.0763	496155	3.75	3.266	21.400			
	4	0.0748	511288	3.76	3.369	22.520			

**Fuente: Elaboración Propia**

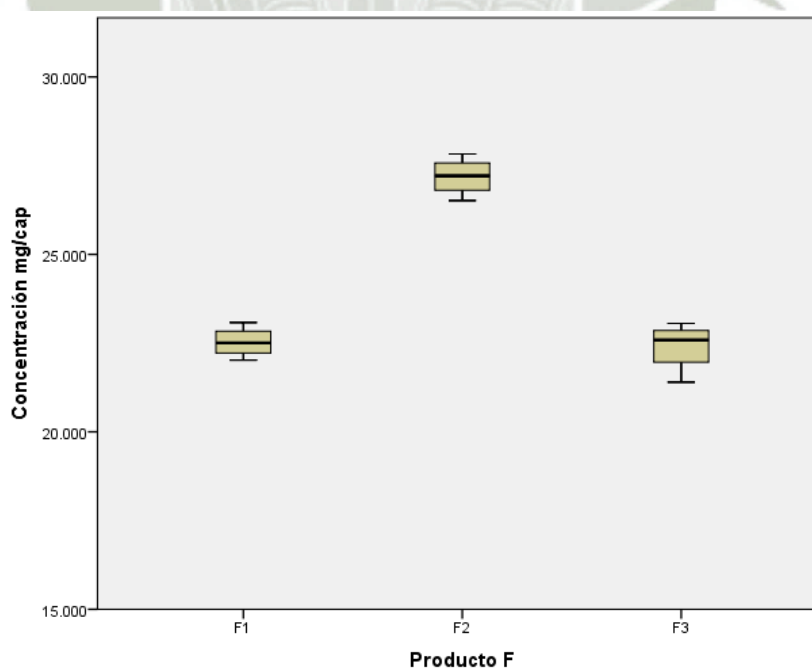
En la Tabla N°22 se observa el análisis ANOVA para el producto F, para este producto en la prueba F de Fisher, se obtuvo un F calculado de 90.093 mayor al F tablas indicando así que existe una diferencia en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así que existe una la diferencia estadísticamente significativa en este producto.

**Tabla N° 22: ANOVA para producto F**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	59.573	2	29.787	90.093	1.1178E-06
<b>Dentro de los grupos</b>	2.976	9	0.331		
<b>Total</b>	62.549	11			

**Fuente: Elaboración propia**

En la Figura N°16 se representa gráficamente el resultado del análisis del producto F, se puede observar la dispersión los datos así como la variabilidad existente del lote F2 frente a los lotes F1 y F3.



**Figura N°16: Diagrama de cajas y bigotes del producto F**

### 3. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE MUESTRAS

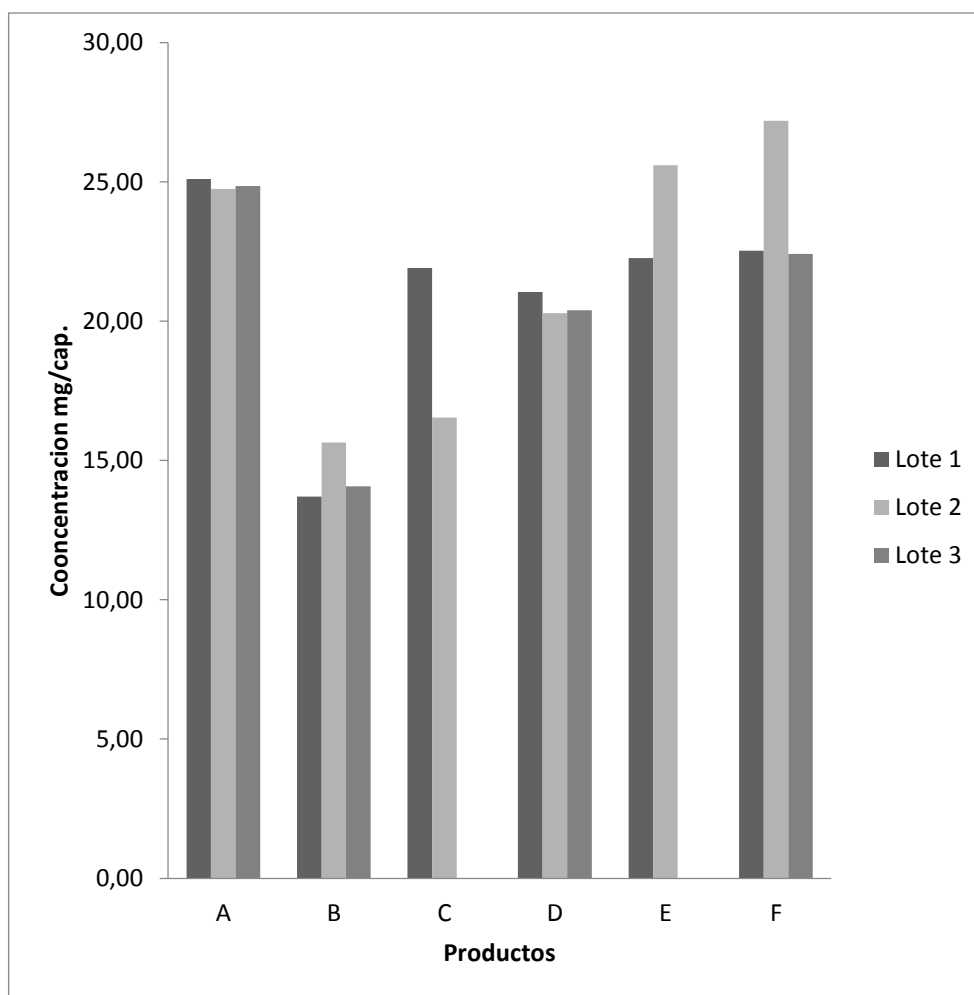
En la Tabla N°23 se presenta la concentración de cinarina hallada para todos los productos analizados, los resultados se encuentra en el rango de 13.706 – 27.193 (mg/cap.) siendo muy amplio; esto podría deberse a los diferentes procedimientos realizados por cada industria tanto en la preparación, obtención de la materia prima y aditivos utilizados en su elaboración.

**Tabla N°23: Concentración de cinarina en productos de alcachofa**

	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>DSR</b>
<b>Producto A</b>	25.098	24.740	24.853	24.897	0.735
<b>Producto B</b>	13.706	15.646	14.075	14.476	7.117
<b>Producto C</b>	21.904	16.539	-	19.222	19.736
<b>Producto D</b>	21.040	20.291	20.384	20.572	1.985
<b>Producto E</b>	22.264	25.591	-	23.928	9.832
<b>Producto F</b>	22.527	27.193	22.408	24.043	11.350

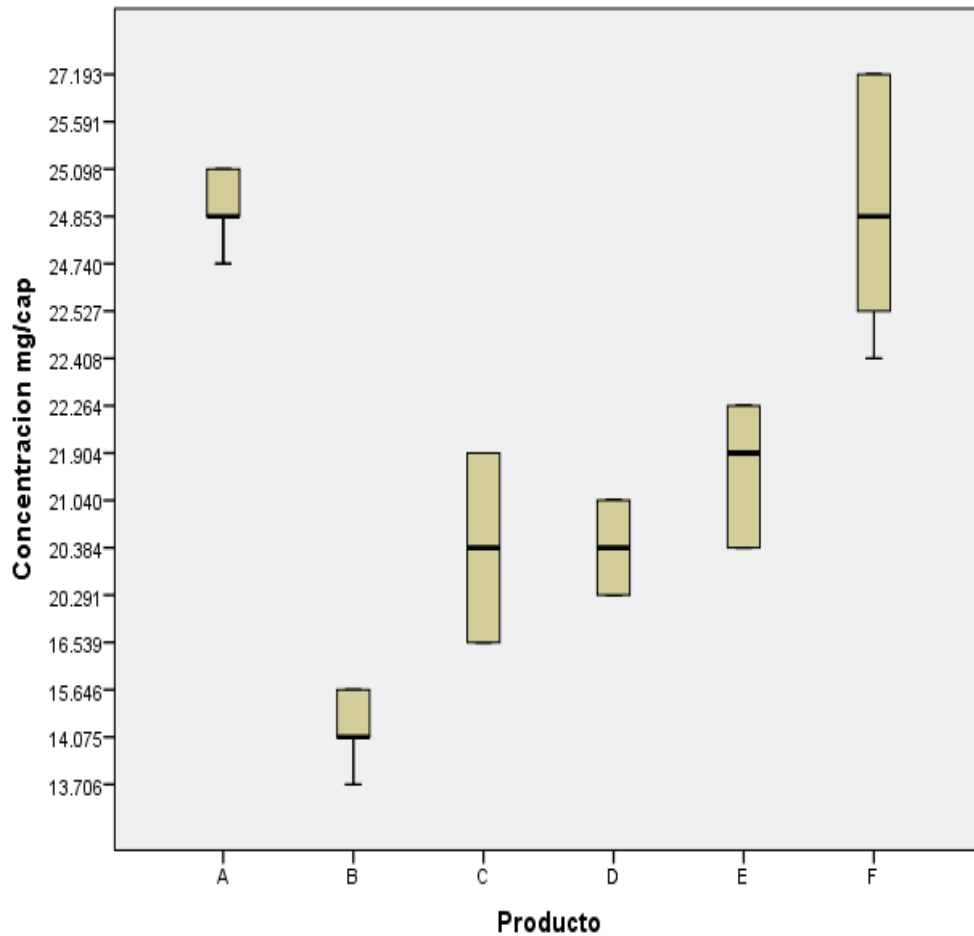
**Fuente: Elaboración Propia**

El contenido total de cinarina en los diferentes productos son expresados en mg/cap. en la Tabla N°23 y se representa gráficamente en la Figura N°17, esto con el fin de ilustrar en forma esquemática la diferencia existente entre lotes y productos; esta grafica no es determinante para afirmar que hay una diferencia significativa entre los grupos de estudio por ello es necesario realizar un análisis estadístico que permita dar un resultado.



**Figura N°17: Diagrama de barras de la concentración de cinarina**

En la Figura N°18 se observa mediante el diagrama de cajas y bigotes. La relación existente entre lotes de un mismo producto, los productos C, D y E están relacionadas con su mediana a diferencia de los productos A, B y F; de igual manera al observar el diagrama, la dispersión de los productos en análisis podríamos afirmar que son diferentes en cuanto a sus concentraciones halladas; para corroborar esta afirmación es necesario la evaluación mediante un test estadístico.



**Figura N°18: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cinarina**

Para comprobar la diferencia significativa entre cada una de las muestras se procedió a desarrollar un análisis de varianza (ANOVA); el análisis de ANOVA unifactorial divide la varianza de los resultados de cinarina en dos subgrupos, entre grupos y dentro de grupos.

La Tabla N°19 se muestra este análisis, la razón F es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos en nuestro caso es resultado fue de 12.036, puesto que el p de la prueba F es menor que 0.05, se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre productos.

**Tabla N°19: ANOVA para cinarina**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
<b>Entre grupos</b>	224.732	5	44.946	12.036	0.001
<b>Dentro de los grupos</b>	37.343	10	3.734		
<b>Total</b>	262.075	15			

**Fuente: Elaboración propia**

En la Tabla N°20 se observar la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene el cual permite contrastar la hipótesis de desigualdad de varianzas poblacional; los grados de libertad para las dos varianzas a comprobar entre los grupos y dentro de grupos; y la significancia en el análisis menor igual que 0.05 valor que indica la desigualdad de varianzas.

**Tabla N°20 Prueba de homogeneidad de varianzas**

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
13,464	5	10	0,000

**Fuente: Elaboración propia**

Estadísticamente se puede observar la diferencia existente, sin embargo para corroborar la diferencia entre grupos es necesario realizar un análisis estadístico entre que grupos; en la Tabla N°21 se puede observar la prueba Games-Howell

desarrollada a partir del resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas, en esta tabla se puede observar los diferentes datos obtenidos pero sin embargo en dato de mayor importancia para ver la diferencia existente entre grupos son los datos de significancia; por lo tanto se puede observar que la diferencia significativa se encuentra entre el producto A y producto B, producto A y producto D, producto B y producto D.



**Tabla N°21 Comparación múltiple test de Games-Howell**

(I) PRODUCTO	(J) PRODUCTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Producto A	Producto B	10.421333*	.604095	,009	5.74243	15.10023
	Producto C	5.675500	2.684580	,585	-70.41892	81.76992
	Producto D	4.325333*	.258300	,003	2.76568	5.88498
	Producto E	.969500	1.666852	,976	-45.68134	47.62034
	Producto F	.854333	1.579080	,987	-12.11252	13.82119
Producto B	Producto A	-10.421333*	.604095	,009	-15.10023	-5.74243
	Producto C	-4.745833	2.747649	,665	-66.98663	57.49496
	Producto D	-6.096000*	.639782	,018	-10.15420	-2.03780
	Producto E	-9.451833	1.766635	,206	-39.22812	20.32446
	Producto F	-9.567000	1.684072	,068	-20.44618	1.31218
Producto C	Producto A	-5.675500	2.684580	,585	-81.76992	70.41892
	Producto B	4.745833	2.747649	,665	-57.49496	66.98663
	Producto D	-1.350167	2.692835	,986	-75.32441	72.62408
	Producto E	-4.706000	3.156428	,712	-37.78978	28.37778
	Producto F	-4.821167	3.110970	,691	-36.42315	26.78082
Producto D	Producto A	-4.325333*	.258300	,003	-5.88498	-2.76568
	Producto B	6.096000*	.639782	,018	2.03780	10.15420
	Producto C	1.350167	2.692835	,986	-72.62408	75.32441
	Producto E	-3.355833	1.680115	,605	-46.79531	40.08364
	Producto F	-3.471000	1.593074	,473	-16.04756	9.10556
Producto E	Producto A	-.969500	1.666852	,976	-47.62034	45.68134
	Producto B	9.451833	1.766635	,206	-20.32446	39.22812
	Producto C	4.706000	3.156428	,712	-28.37778	37.78978
	Producto D	3.355833	1.680115	,605	-40.08364	46.79531
	Producto F	-.115167	2.291192	1,000	-14.87811	14.64778
Producto F	Producto A	-.854333	1.579080	,987	-13.82119	12.11252
	Producto B	9.567000	1.684072	,068	-1.31218	20.44618
	Producto C	4.821167	3.110970	,691	-26.78082	36.42315
	Producto D	3.471000	1.593074	,473	-9.10556	16.04756
	Producto E	.115167	2.291192	1,000	-14.64778	14.87811

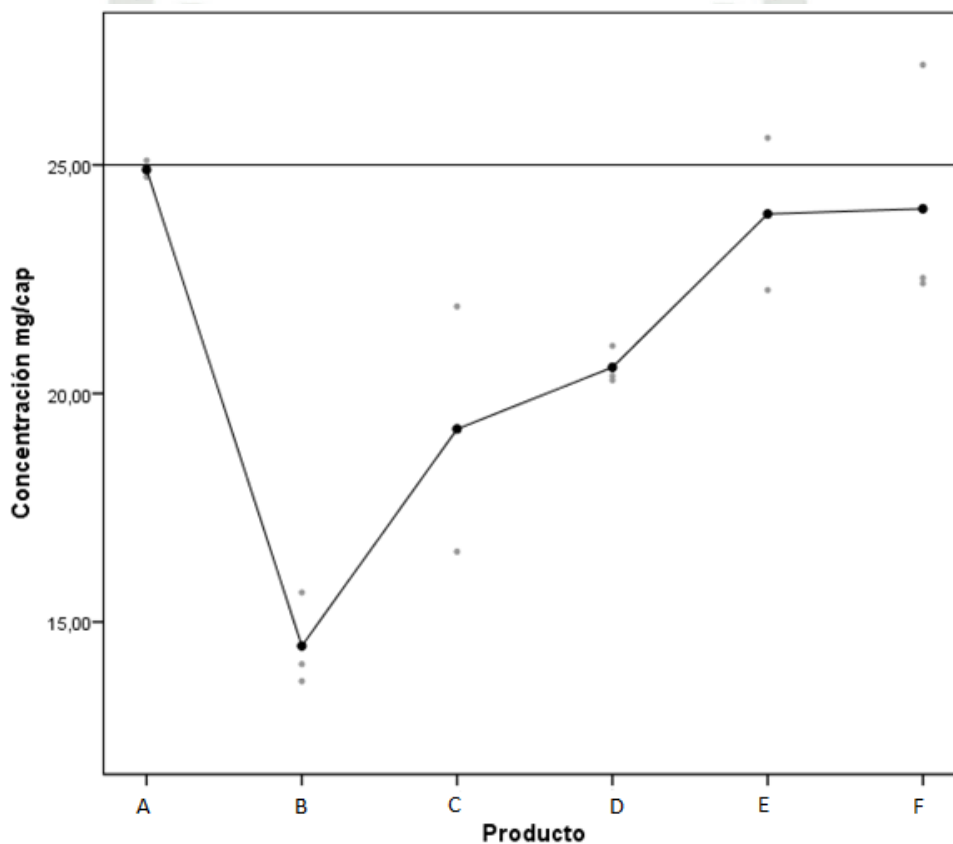
\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

**Fuente: Elaboración Propia**

Según los parámetros establecido por Dietary Supplements and Herbal Medicines (DSHM) con relación al contenido de cinarina en alcachofa establece como valor mínimo el 5% en suplementos dietéticos. Los resultados obtenidos en nuestro

análisis muestran una variabilidad amplia las cuales fueron explicadas anteriormente en las Tablas N°19 y 21.

En la figura N°19 se puede observar la dispersión de los diferentes productos con relación al valor establecido; la línea de referencia superpuesta con referencia al eje Y y la relación de con los mismos. El producto A presenta valores cercanos al valor establecido, a diferencia de los productos B,C y D que se encuentran por debajo, los productos E y F se encuentran dispersos tanto por debajo y por encima del valor de referencia.



**Figura N°19 Diagrama de dispersión de productos**

Para contrastar la diferencia medida con la cantidad dada se aplica la prueba estadística denominada contraste de significación. Aplicando así la siguiente fórmula:

$$t = ((\bar{x} - \mu)\sqrt{n}) / s$$

Donde:

$\bar{x}$ = media muestral

$\mu$ = valor de referencia

$s$ =desviación estándar muestral

$n$ =tamaño muestral

Si  $t$  es mayor que el valor crítico se podría afirmar que si hay evidencia de error sistemático concluyendo así la diferencia existente entre el resultado obtenido y el valor dado. Al aplicar la fórmula para cada producto se obtuvo que los productos que difieren del valor establecido; producto B de 4.3 y D 12 71.

El propósito de nuestro trabajo fue garantizar que el uso de productos a base de alcachofa sea el adecuado para el consumidor, estudios semejantes se realizaron en diferentes países como por ejemplo para Lutz M., et al.(2011) indica que la diferencia del contenido de compuestos fenólicos varía entre los diferentes cultivos, la edad, la generación de la planta, las condiciones de cultivo, cosecha, post-cosecha, las condiciones de almacenamiento, y los procedimientos tecnológicos utilizados por las industrias farmacéuticas dedicadas a la elaboración de fitofármacos las cuales someten a la materia prima vegetal a procesos de secado y estabilización, esto explicaría la diferencia significativa existente.<sup>52</sup>

Domingo R. et al. (2014), en su estudio sobre las propiedades química y funcionales de los diferentes productos de alcachofa, revela que existe una diferencia significativa en cuanto al procesamiento industrial y su relación a la composición química y propiedades funcionales, determinando que el contenido de flavonoides y derivados cafeoilquinicos, es variable, siendo este un estudio que podría explicar la variabilidad de nuestros resultados.<sup>18</sup>

Sandra C. et al. (2012), En su trabajo titulado composición fenólica y capacidad antioxidante en suplementos dietéticos a base de alcachofa, encontraron una variación cualitativa y cuantitativa en tres productos a base de alcachofa, donde la cinarina considerada responsable de las propiedades biológicas está en un rango

de 2.21 mg/100 g relacionada con el extracto y contrariamente a lo esperado no se detectaron en las muestra de grageas.<sup>53</sup>

Alonso R. et al. (2007) En su estudio de investigación titulado comprimidos comerciales con extracto de alcachofa en el mercado farmacéutico argentino: comparación de los perfiles de disolución y valoración de cinarina y ácido clorogénico por HPLC; encontró en su análisis de las formulaciones las diferencias de contenido de cinarina (trazas, 1.10 y 1.72 mg/ comprimido) y ácido clorogénico (valores mayores a 0.86 mg/ comprimido), siendo la proporción de ambos marcadores diferente en las tres formulaciones; esta variación de resultados del contenido de cinarina también se presentó en nuestro estudio haciendo que no haya equivalencia farmacéutica debido a que es un requisito de igualdad del mismo.<sup>32</sup>

Florinda F. et al. (2007), en el análisis de los polifenoles de las hojas y las diferentes partes (brácteas exteriores, intermedio e interno, y receptáculo) de las cabezas de alcachofa, demostró que los polifenoles se acumulan preferentemente en partes específicas de las cabezas y en las brácteas; representando una invaluable fuente de compuestos bioactivos específicos, tanto para su uso en aplicaciones nutraceuticas, farmacológicas como para la obtención de nuevas variedades con una mayor calidad en cuanto a los efectos beneficiosos y terapéuticos.<sup>32</sup>

## CONCLUSIONES

- **Primera:** La cinarina se puede determinar mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa, con un sistema cromatográfico en gradiente a una velocidad de flujo de 2 mL/min, fase móvil “A” (0.004% de ácido fosfórico en acetonitrilo) y fase móvil “B” (0.004% de ácido fosfórico en agua), a una longitud de onda de 330 nm, tiempo de retención de 3.7 min aproximadamente y en un rango de cuantificación de 1mg/L a 8 mg/L.
- **Segunda:** El método propuesto es selectivo ya que no se presentaron interferencias al realizar el análisis en diferentes condiciones, es lineal puesto que se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación de 0.998, el método es exacto debido al grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor esperado y es preciso puesto que al determinar la media de dispersión alrededor de un valor medio fue <2%.
- **Tercera:** Se logró cuantificar el contenido de cinarina para cada una de las muestras comerciales de alcachofa encontrando valores dentro de un rango de 13.706 – 27.193 (mg/cap).
- **Cuarta:** La comparación de los resultados en los diferentes productos analizados muestra la variación existente entre productos obteniendo como resultado promedio para el producto A-24.897 mg/cap, producto B-14.476 mg/cap, producto C-19.222 mg/cap, producto D-20.572 mg/cap, producto E-23.928 mg/cap y producto F-24.043 mg/cap.

- **Quinta:** La evaluación de productos se realizó mediante un análisis estadístico, demostrando la diferencia significativa existente dentro de lotes de un mismo producto y entre los productos, obteniendo como resultados la diferencia entre los lotes de cada industria como en los diferentes grupos de análisis.



## SUGERENCIAS

- Realizar un estudio de estabilidad para así conocer las características físicas y químicas durante el tiempo de almacenamiento, la influencia de factores ambientales y establecer las condiciones de almacenamiento adecuadas y el periodo de caducidad.
- Supervisión por parte de la autoridad de salud a nivel regional para controlar la calidad de los productos naturales comercializados.
- Se recomienda al público consumidor que adquiera productos naturales en establecimientos autorizados así como verificar el registro sanitario, fecha de caducidad y almacenamiento del producto.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso R, Spagnuolo A, Rubio M y Ferraro G. Comprimidos comerciales con extracto de alcachofa en el mercado farmacéutico argentino: comparación de los perfiles de disolución y valoración de cinarina y ácido clorogénico por HPLC. *Lat Am J Pharm* 2007; 26 (3): 399-403.
2. Martín C, Ana P, Nino C, Juan C. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus L.*). *Rev soc quím Perú*. 2013; (79): 57-63.
3. Aksu O, Altinterim B. Hepatoprotective effects of artichoke (*Cynara scolymus*). *Genet mol biol*. 2013; (1): 44-49.
4. Ceren G, Sevinc Y, Suresh R. Artichoke compound cynarin differentially affects the survival, growth, and stress response of normal, immortalized, and cancerous human cells. *Turk J biol*. 2015; (39): 299-305.
5. Mona A, Salah H, Sahar Z, Rania E. Artichoke (*Cynara scolymus L.*) leaves and heads extracts as hypoglycemic and hypocholesterolemic in rats. *SciEP*. 2016; 4(1): 60-68.
6. Mohamed F, Sherweit A, Fatma E, Ludger W. Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC–q-TOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*. 2013; (95):177-187.
7. Ricieri M, et al. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of *Cynara scolymus* in cholesterol-fed rats. *Bra J pharmacogn*. 2016; 26(2): 233-239.
8. Mulinacci N, et al. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *J Pharm biomed Anal*. 2004;(34): 349-357.

9. Ramiro F, Silvia Luz J. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2da ed. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2007.
10. Estilita E. Uso farmacéutico de las hojas de alcachofa. *Offarm.* 2003; 22(9) 138-140.
11. Jorge P. Salud por los alimentos. 1ra ed. España: Editorial Safeliz S.L. 2006.
12. Alsina L. El cultivo de la alcachofa y del cardo. España: Editorial Síntesis S. A. Barcelona; 1980.
13. Alsina L. Horticultura especial. Tomo I. España: Editorial Síntesis S. A. Barcelona; 1980.
14. Basnizki J, Zohari D. Breeding of ssed-planted artichoke. *Breed Rev.* 1994; 12:253-269.
15. Jean B. Farmacognosia, fotoquímica plantas medicinales. 3ra ed. España: Editorial Acribia S.A; 2001.
16. Bernat V, Salvador C. Fitoterapia. 4ta ed. España: Editorial Masson; 2003
17. Vincenzo L, Paul K, Vito L, Angela C. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J FunCt food.* 2009;(1): 131-144.
18. Domingo R, et al. Chemical and functional properties of the different by-products of artichoke (*Cynara scolymus L.*) from industrial canning processing. *J Agric food chem.* 2014;(160):134-140.
19. Pandino G, Lombardo S, Mauromicale G, Williamson G. Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus var. scolymus*) germplasm. *J Food compost anal.* 2011; (24): 148-153.
20. Ibrahim A, David A, Antonio S, Alberto F. Extensive characterisation of biactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus L.*) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *J Agric food chem.* 2013; (141): 2269-2277.
21. Esfandiar H, Yadollah S. Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med plan.* 2011;5(13): 2717-2723.
22. T. Saénz, D. García, R. de la Puerta. Choloretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine.* 2002;9(8):687-693.

23. Jacek W. Effect of 1,5-dicaffeoylquinic acid (cynarine) on cholesterol levels in serum and liver of acute ethanol-treated rats. *J Alcohol drug depend.* 2004; 3(2): 143-145.
24. Englisch W, Beckers C, Unkauf M, Ruepp M, Zinserling V. Efficacy of artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia. *Arzneimittelforschung.* 2000; 50(3):260-265.
25. Bundy R , Walker AF , Middleton RW , Wallis C , Simpson HC. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine.* 2008; 15(9):668-675.
26. Emine C, Mehmet U, Neslihan T, Ertugrul C, Dilek B, Irfan Degirmenci and Hasan Veysi Gunes. The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *SpringerOpen[Internet].* 2016[Citado 1 de abril 2016].
27. Diana O. Efecto hepatoprotector del extracto de las hojas de alcachofa (*cynara scolymus*) en ratas (*rattus novergicus*) con hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador; 2012.
28. Holtmann G, Adam B, Haag S, Collet W, Grünewald E, Windeck T. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Alimen, Pharma and Thera.*2003; 18(11): 1099–1105.
29. Xu C, Haibing X, Ying Z, Liangyu Z, Yinghao Ch, Xiaofan Ch. 1, 5-Dicaffeoylquinic acid-mediated glutathione synthesis through activation of Nrf2 protects against OGD/reperfusion-induced oxidative stress in astrocytes. *Elsevier.*2010; (1347): 142-148.
30. Ruolan G, Guifang D, Jing W, Junxing D, Zhiyun M. Simultaneous determination of 1,5-dicaffeoylquinic acid and its active metabolites in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies. *J FunCt food.* 2007; 852(1-2): 85-91.
31. Claudia K. *Farmacognosia.* España: Editorial Omega; 2003.
32. Florinda F, Marina T, Monica P, Rosa P, Filomena N. Polyphenolic composition in different parts of some cultivar of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L. *J FunCt food* . 2007; (104): 1982-1987.

33. Maria A, Maria G, Claudia G, Graciela F, Modesto R. Validated HPLC method for cynarin determination in biological samples. *Acta Farm Bonaerense*. 2006; 25 (2) : 267-270.
34. Wang et al. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus L.*). *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51 (3):601–608.
35. Gebhardt R. Anticholestatic activity of flavonoids from artichoke and of their metabolites. *Med Sci. Monit.* 2001; suppl 7(1):316-320.
36. Barcelli V. Curso de entrenamiento de cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Lachrom Merck, Lima: Abril 2009
37. Oscar Q, Sara A, Raúl L. Introducción a la HPLC. 1ra ed. Argentina: Artes Gráficas Farro; 1992.
38. Edgar E, Lidia L. Cromatografía en fase reversa. Instituto de biotecnología. Cuernavaca: Junio 2004.
39. Maria SG, Maria GB, Domingo GM, Domingo MA, Luis SG, Maria CA, Antonio RR, Odette OG, Jose CC, Eva PC, Angel VA, Jose AP. Técnico especialista en laboratorio del servicio gallego de salud. Vol 1. 1ra ed. España: Mad SL; 2006.
40. Roger M. HPLC. A practical guide. 1ra ed. UK: The Royal Society of chemistry; 1999.
41. USP XXXVII Farmacopea de los Estados Unidos de America, XXXII formulario nacional <1225> validación de procedimientos farmacopeicos.
42. Asociación española de farmacéuticos de la industria. validación de métodos analíticos. España: A.E.I.F.; 2001.
43. Joel S. HPLC Practical and industrial applications. 2da edición. USA: CRC Press; 2001.
44. Neung J, et al. Radical Scavenging activity and content of cynarin (1,5-dicaffeoylquinic acid) in artichoke (*Cynara scolymus L.*). *J. Appl. Biol. Chem.* 2007; 50(4):244-248.
45. Paula B, Michael C, Lory P, Joseph B. Determination of major phenolic compounds in echinacea spp. Raw materials and finished product by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single laboratory validation matrix extension. *JAOAC*. 2011; 94(5):1400-1410.

46. Adzet T, Puigmacia M. High performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolymus L.* leaves. *J. Agric. Food Chem.* 1985; 34: 447-453.
47. Ireneusz K, Ewa S, Dorota B, Tomasz C, Joanna K, Renata T. Identification and quantification of phenolic compound from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*). *WFL Publisher.* 2013; 34(11): 601-606.
48. Federica P, Stefania B, Lara M, Michele M, Fabrizia S. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of echinacea spp. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 35: 289-301.
49. Mulinacci N, Pucher D, Peruzi M, Romani A, Pinelli P, Giaccherini C, Vinveri F. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 34: 349-357.
50. Katrin S, Dietmar K, Reinhold C, Andreas S. Identification and quantification of caffeoylquinic acid and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *JAgriFChem.* 2004; 52:4090-4096.
51. Lutz M, Henriquez C, Escobar M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus L.*), raw and cooked. *J. Food comp anal.* 2011; 24:49-54.
52. Sandra C, Paula C. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Res Int.* 2012; 48:712-724.

## ANEXOS

### 1. CERTIFICADO DE ESTANDAR CINARINA

Addr: 2F, No.11 Building, No.388 Rongtaidadao CNSTP,  
Wenjiang Zone, Chengdu, Sichuan, China 611130  
TEL: 028-82633987 FAX: 028-82633165  
E-mail: sales@biopurify.com  
Web: http://www.biopurify.com



成都普瑞法科技开发有限公司  
Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.

#### 1,5-Dicaffeoylquinic acid HPLC TEST METHOD

**Column Type:** Thermo BDS Hypersil C18 2.4 $\mu$ m

**Column Dimensions:** 100 x 4.6 mm. ID

**Mobile Phases:**

Time (in min.)	0	15	15.1	20
Acetonitrile%	15	25	15	15
0.1% Phosphate in Water %	85	75	85	85

**Flow Rate:** 1 ml/min

**Detection Mode and Setting:** UV330nm

**Sample Diluent(s):** 80% Methanol in water (Please note, the sample solvent is very important)

**Sample Concentration:** Approx 50 $\mu$ g/ml

**Injection Volume:** 10 $\mu$ l.

**Retention Time:** About 6.7 min

**Calculation:** Area percent normalizati

## Material Safety Data Sheet

Date of Issue: 11/09/2009

### 1. Chemical Identification

**Product Name:** Reference substance Dicafeoylquinic acid

**CAS Number:** 32451-88-0

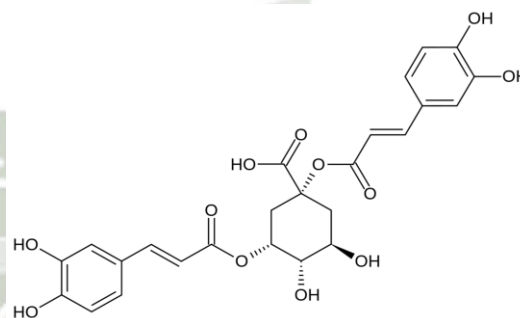
**Mol. Formula:** C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>

**Mol. Weight:** 516.46

**Botanical Source:**

Eucommia Bark; Flos Lonicerae

**Structure:**



### 2. Hazards identification

**CAUTION:** May be harmful to skin and eyes if swallowed, inhaled or absorbed through skin. The chemical, Physical and toxicological properties of this product have not been thoroughly investigated. Exercise due care.

### 3. First-aid measures

**If swallowed:** Give large quantities of water to drink and get medical attention immediately, never give anything by mouth to an unconscious person. Call a physician.

**In case of skin contact:** Wash exposed area with soap and water. Call a physician if irritation develops.

**If inhaled:** Remove to fresh air. If breathing becomes difficult, Call a physician .

**If Contact with eye:** Flush with copious amounts of water at least 15 minutes, Assure adequate Flushing by separating the eyelids with fingers. Call a physician.

### 5. Fire-fighting measures

**Extinguishing Media:**

carbon dioxide, dry chemical power or appropriate form.

**Special fire-fighting procedures:**



Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing to prevent with skin and

eyes. Full turnout gear.

Unusual fire and explosions hazard:

Not considered to be a fire hazard nor an explosions hazard.

## 6、Accidental release measures

Wear respirator, chemical safety goggles, rubber boots and heavy rubber gloves.

Sweep up, place in a bag and hold for waste disposal.

Avoid raising dust. Pickup and place in a suitable container for disposal in a method that does not generate dust.

Ventilate area and wash spill site after material pickup is complete.

## 7、Handing and storage

Store below 25°C in a desiccated environment and protected from light.

Containers of this material may be hazardous when empty since they retain product residues (dust, solids); observe all warnings and precautions listed for the product.

## 8、Exposure controls/personal protection

NIOSH/MSHA-approved respirator.

Mechanical exhaust.

Compatible chemical-resistant gloves.

Chemical safety goggles.

## 9、Physical and chemical properties

Physical state : Off white Powder

Color : Off white

Molecular Weight : 516.46

Melting Point : 140°C

Solubility : Soluble in Ethanol, Methanol, DMSO, Pyridine

Flash point : Not available.

## 10、Stability and reactivity

Stability:

They all stable under ordinary conditions of use and storage.

Hazardous combustion or decomposition products:



Not yet available.

Hazardous Polymerization:

Not yet available.

#### 11、 Toxicological information

Skin irritation: Not available.

Acute toxicity: LD<sub>50</sub>: 2417mg/kg

Carcinogenic effects: Not available.

Mutagenic effects: Not available.

Reproduction effects: Not available.

Teratogenic effects: Not available.

#### 12、 Ecological information

Ecotoxicity: Not available

#### 13、 Disposal considerations

Dissolve or mix the material with a combustible solvent and burn in a chemical incinerator equipped with an afterburner and scrubber. Observe all Federal, State and Local Environmental Regulations.

#### 14、 Transport information

Contact Chengdu Purification for transportation information.

#### 15、 Regulatory information

Data is not available.

#### 16、 Other information

#### DISCLAIMER

For R&D use only. Not for drug, household or other uses.

#### WARRANTY

The information presented herein is believed to be accurate and representative of currently accepted technical literature. However, Chengdu Biopurify does not mean to imply its completeness or comprehensiveness. Therefore, we suggest the use of this information solely as a guide in the use and handling of this product, and further urge the user to determine the suitability of this material for any particular purpose. Chengdu Biopurify shall not be held liable for any damages resulting from sole reliance on this information.

## 2. ANALISIS ESTADISTICO DE PRODUCTOS COMERCIALES

### 2.1. PRODUCTO A

#### Análisis de Media

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Incluidos		Excluidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Concentracion * ProductoA	12	100,0%	0	0,0%	12	100,0%

#### Informe

##### Concentracion

ProductoA	Media	N	Desv. típ.
A1	25.09788	4	.173171
A2	24.74003	4	.320380
A3	24.85317	4	.198366
Total	24.89703	12	.266899

### 2.2. PRODUCTO B

#### Análisis de Media

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Incluidos		Excluidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ConcenB * ProductoB	12	100,0%	0	0,0%	12	100,0%

#### Informe

##### ConcenB

ProductoB	Media	N	Desv. típ.
B1	13.70606	4	.257013
B2	15.64622	4	.349570
B3	14.07484	4	.189777
Total	14.47571	12	.912810

## 2.3. PRODUCTO C

### Análisis de Media

**Resumen del procesamiento de los casos**

	Casos					
	Incluidos		Excluidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ConC * ProductoC	8	66,7%	4	33,3%	12	100,0%

### Informe

ConC

ProductoC	Media	N	Desv. típ.
C1	21.90388	4	.130498
C2	16.53921	4	.249330
Total	19.22155	8	2.873447

## 2.4. PRODUCTO D

### Análisis de Media

**Resumen del procesamiento de los casos**

	Casos					
	Incluidos		Excluidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ConD * ProductoD	12	100,0%	0	0,0%	12	100,0%

### Informe

ConD

ProductoD	Media	N	Desv. típ.
D1	21.03977	4	.494213
D2	20.29080	4	.307542
D3	20.38386	4	.578183
Total	20.57148	12	.552062

## 2.5. PRODUCTO E

### Análisis de Media

**Resumen del procesamiento de los casos**

	Casos					
	Incluidos		Excluidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ConE * ProdE	8	66,7%	4	33,3%	12	100,0%

### Informe

ConE

ProdE	Media	N	Desv. típ.
E1	22.26424	4	.693462
E2	25.59105	4	.488299
Total	23.92765	8	1.862921

## 2.6. PRODUCTO F

### Análisis de Media

**Resumen del procesamiento de los casos**

	Casos					
	Incluidos		Excluidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ConF * ProdF	12	100,0%	0	0,0%	12	100,0%

### Informe

ConF

ProdF	Media	N	Desv. típ.
F1	22.52715	4	.438235
F2	27.19306	4	.544483
F3	22.40818	4	.709471
Total	24.04279	12	2.384589

### 3. ANALISIS ESTADISTICO ENTRE MUESTRAS

#### ANOVA de un factor

##### ANOVA de un factor

##### CONCENTRACION

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	224,732	5	44,946	12,036	,001
Intra-grupos	37,343	10	3,734		
Total	262,075	15			



**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: CONCENTRACION

	(I) PRODUCTO	(J) PRODUCTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	1	2	10.421333 <sup>*</sup>	1.577825	,001	4.94104	15.90162
		3	5.675500	1.764062	,074	-.45165	11.80265
		4	4.325333	1.577825	,150	-1.15496	9.80562
		5	.969500	1.764062	,992	-5.15765	7.09665
		6	.854333	1.577825	,993	-4.62596	6.33462
		1	-10.421333 <sup>*</sup>	1.577825	,001	-15.90162	-4.94104
	2	3	-4.745833	1.764062	,161	-10.87298	1.38132
		4	-6.096000 <sup>*</sup>	1.577825	,028	-11.57629	-.61571
		5	-9.451833 <sup>*</sup>	1.764062	,003	-15.57898	-3.32468
		6	-9.567000 <sup>*</sup>	1.577825	,001	-15.04729	-4.08671
		1	-5.675500	1.764062	,074	-11.80265	.45165
		2	4.745833	1.764062	,161	-1.38132	10.87298
	3	4	-1.350167	1.764062	,968	-7.47732	4.77698
		5	-4.706000	1.932433	,231	-11.41796	2.00596
		6	-4.821167	1.764062	,152	-10.94832	1.30598
		1	-4.325333	1.577825	,150	-9.80562	1.15496
		2	6.096000 <sup>*</sup>	1.577825	,028	.61571	11.57629
		3	1.350167	1.764062	,968	-4.77698	7.47732
4	5	-3.355833	1.764062	,452	-9.48298	2.77132	
	6	-3.471000	1.577825	,316	-8.95129	2.00929	
	1	-.969500	1.764062	,992	-7.09665	5.15765	
	2	9.451833 <sup>*</sup>	1.764062	,003	3.32468	15.57898	
	3	4.706000	1.932433	,231	-2.00596	11.41796	
	4	3.355833	1.764062	,452	-2.77132	9.48298	
5	6	-.115167	1.764062	1,000	-6.24232	6.01198	
	1	-.854333	1.577825	,993	-6.33462	4.62596	
	2	9.567000 <sup>*</sup>	1.577825	,001	4.08671	15.04729	

		3	4.821167	1.764062	,152	-1.30598	10.94832
		4	3.471000	1.577825	,316	-2.00929	8.95129
		5	.115167	1.764062	1,000	-6.01198	6.24232
		2	10.421333*	.604095	,009	5.74243	15.10023
		3	5.675500	2.684580	,585	-70.41892	81.76992
	1	4	4.325333*	.258300	,003	2.76568	5.88498
		5	.969500	1.666852	,976	-45.68134	47.62034
		6	.854333	1.579080	,987	-12.11252	13.82119
		1	-10.421333*	.604095	,009	-15.10023	-5.74243
		3	-4.745833	2.747649	,665	-66.98663	57.49496
	2	4	-6.096000*	.639782	,018	-10.15420	-2.03780
		5	-9.451833	1.766635	,206	-39.22812	20.32446
		6	-9.567000	1.684072	,068	-20.44618	1.31218
		1	-5.675500	2.684580	,585	-81.76992	70.41892
		2	4.745833	2.747649	,665	-57.49496	66.98663
	3	4	-1.350167	2.692835	,986	-75.32441	72.62408
		5	-4.706000	3.156428	,712	-37.78978	28.37778
		6	-4.821167	3.110970	,691	-36.42315	26.78082
Games-		1	-4.325333*	.258300	,003	-5.88498	-2.76568
Howell		2	6.096000*	.639782	,018	2.03780	10.15420
	4	3	1.350167	2.692835	,986	-72.62408	75.32441
		5	-3.355833	1.680115	,605	-46.79531	40.08364
		6	-3.471000	1.593074	,473	-16.04756	9.10556
		1	-.969500	1.666852	,976	-47.62034	45.68134
		2	9.451833	1.766635	,206	-20.32446	39.22812
	5	3	4.706000	3.156428	,712	-28.37778	37.78978
		4	3.355833	1.680115	,605	-40.08364	46.79531
		6	-.115167	2.291192	1,000	-14.87811	14.64778
		1	-.854333	1.579080	,987	-13.82119	12.11252
		2	9.567000	1.684072	,068	-1.31218	20.44618
	6	3	4.821167	3.110970	,691	-26.78082	36.42315
		4	3.471000	1.593074	,473	-9.10556	16.04756
		5	.115167	2.291192	1,000	-14.64778	14.87811

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

#### **4. DECRETOSUPREMON 010-97-SA:REGLAMENTO PARA EL REGISTRO, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y AFINES**

### **TITULO CUARTO**

### **DE LOS RECURSOS TERAPEUTICOS NATURALES**

#### **CAPITULO I**

#### **DE LA CLASIFICACIÓN DE LOS RECURSOS TERAPÉUTICOS NATURALES**

**Artículo 77°.-** Los recursos terapéuticos naturales se clasifican en:

- a) Recurso terapéutico natural de uso en salud
- b) Producto terapéutico natural de uso en salud.

**Artículo 78°.-** Recurso terapéutico natural de uso en salud: son aquellos recursos de la naturaleza, que tienen propiedades terapéuticas, pertenecientes a los reinos vegetal, animal y mineral que no han sido procesados o que lo han sido de manera muy primaria (trozados, deshidratados, molidos, etc.) y que constituyen la materia prima para preparados u otros productos terapéuticos naturales elaborados.

Podrá ser comercializado sin Registro Sanitario, siempre que en el rotulado de su envase no aparezcan indicaciones de uso terapéutico alguno.

**Artículo 79°.-** Producto terapéutico natural de uso en salud: Es todo producto elaborado con uno o varios recursos naturales, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye propiedades terapéuticas, basados en el conocimiento popular o tradicional, sin evidencias conocidas de riesgo para la salud del usuario cuya eficacia es validada a través de estudios etno-farmacológicos y de utilización, documentos técnico científicos o publicaciones indexadas.

Sólo se autorizará los productos terapéuticos naturales de uso en salud a aquellos que presentan formas farmacéuticas de uso oral o tópico.

#### **CAPITULO II**

#### **REQUISITOS PARA LA OBTENCION DE INSCRIPCIÓN O REINSCRIPCIÓN DEL REGISTRO SANITARIO DE LOS RECURSOS NATURALES DE USO EN SALUD**

**Artículo 80°.-** Para la inscripción en el Registro Sanitario se deberá presentar una solicitud con carácter de Declaración Jurada suscrita por el representante legal y por el

químico farmacéutico responsable, en la que se deberá consignar la siguiente información:

- a) Objeto de la solicitud.
- b) Nombre científico por género y especie del recurso y/o común más conocido en español.
- c) Nombre o razón social, dirección y país del fabricante.
- d) Nombre o razón social, dirección y Registro Único del Contribuyente del solicitante así como del químico farmacéutico responsable o del director técnico
- e) Si el recurso terapéutico natural es vegetal, se deberá señalar el nombre científico por género, especie o variedad, cuando corresponda.
- f) Si el recurso terapéutico natural es vegetal o animal, se deberá señalar las partes de la planta o del animal utilizadas.
- g) Clasificación taxonómica del recurso terapéutico natural y descripción de las partes usadas de la planta o animal.
- h) Para recursos de origen vegetal, se incluirá información respecto al tipo de plaguicidas o fertilizantes utilizados y condiciones de almacenamiento y conservación. i) Composición cuali-cuantitativa, expresada en unidades de peso, indicando el nombre científico del o los recursos naturales.
- j) Forma de presentación.
- k) Tipo y material del envase mediato e inmediato.
- l) Uso recomendado.
- m) Sistema de codificación utilizado del número de lote, tratándose de producto importado.

Para el caso de reinscripción de Registro Sanitario, adicional a la solicitud se consignará la información señalada en los literales a), b), c), d) y h).

**Artículo 81°.-** Adjunto a la solicitud de inscripción se deberá acompañar la siguiente documentación:

- a) Protocolo de análisis, incluyendo especificaciones técnicas y resultados.
- b) Certificado de Libre Comercialización, si el recurso es importado.
- c) Monografía que contenga la descripción botánica (en el caso de recursos vegetales), identificación taxonómica y estudios clínicos y/o literatura científica que respalden el uso recomendado, dosificación, contraindicaciones y precauciones.
- d) Proyecto de rotulado de envase mediato e inmediato.

e) Comprobante de pago por concepto de registro.

Para el caso de reinscripción de Registro Sanitario, se deberá presentar la solicitud consignando la información señalada en los literales a), b), c), d) y h), y los requisitos descritos en los literales a), b) y e).

**Artículo 82°.-** El protocolo de análisis debe incluir el control físico-químico y microbiológico de los recursos naturales usados. Pueden emplearse otros métodos de identificación aceptados en farmacopeas. En el caso de recursos de origen vegetal el protocolo deberá considerar el ensayo de determinación de metales pesados.

**Artículo 83°.-** El rotulado de los envases del recurso terapéutico natural deberá consignar la siguiente información:

- a) Nombre científico y/o común del recurso terapéutico natural, considerando el de mayor actividad terapéutica si se trata de una combinación.
- b) Composición cuantitativa y cualitativa del recurso, expresado por unidad de peso utilizando el sistema centesimal.
- c) Uso tradicional recomendado y precauciones.
- d) Contraindicaciones y advertencias, si tuviese.
- e) Condiciones de almacenamiento.
- f) Contenido neto por envase.
- g) Nombre y país del laboratorio fabricante.
- h) Número de Registro Sanitario. i) Número de lote y fecha de vencimiento.
- j) Nombre del director técnico para laboratorios nacionales.
- k) Nombre, dirección del importador, Registro Único de Contribuyente y nombre de químico farmacéutico responsable, en caso que los productos sean importados.
- l) Leyendas "Si se observan reacciones adversas, interrumpir su uso". "Consulte con su médico", "Manténgase fuera del alcance de los niños", "Guardar en lugar fresco y seco". Asimismo, cuando corresponda "Protéjase de la luz".
- m) Condición de venta. Los rotulados de los recursos naturales de venta bajo receta médica no deberán consignar información relativa al uso recomendado.

**Artículo 84°.-** No procederán cambios o modificaciones del nombre o composición de un recurso terapéutico natural de uso en salud. La modificación en la información técnica del rotulado o del prospecto o inserto, según corresponda, deberá ser solicitada por el interesado a la DIGEMID, acompañando a la solicitud la información y documentación sustentatoria de la modificación.

**Artículo 85°.-** La condición de venta de los recursos terapéuticos naturales de uso en salud es sin receta médica en establecimientos farmacéuticos, casas naturistas o comerciales, conforme a lo autorizado al otorgarse el Registro Sanitario, salvo que se trate de un recurso de origen vegetal comprendido en el listado de plantas medicinales de uso restringido, a que se refiere la Ley General de Salud o de una asociación de recursos terapéuticos naturales. Para la condición de venta en el caso de asociaciones de recursos terapéuticos naturales de uso en salud deberá presentar la opinión del Comité Especializado del Ministerio de Salud o quien realice sus funciones. Es de aplicación a los recursos naturales de uso en salud lo dispuesto los artículos 40° y 102° del presente Reglamento.

**Artículo 86°.-** La codificación del Registro Sanitario del recurso terapéutico natural se hará de la siguiente forma:

RTNN0000 : Recurso terapéutico natural nacional.

RTNE0000 : Recurso terapéutico natural extranjero.

### CAPITULO III

#### REQUISITOS PARA LA OBTENCIÓN DE INSCRIPCIÓN O REINSCRIPCIÓN REGISTRO SANITARIO DE LOS PRODUCTOS TERAPÉUTICOS NATURALES DE USO EN SALUD

**Artículo 87°.-** El Registro Sanitario para productos terapéuticos naturales de uso en salud será otorgado por producto, concentración, forma farmacéutica, fabricante y país.

**Artículo 88°.-** La comercialización de los productos terapéuticos naturales de uso en salud se hará bajo prescripción médica o sin ella, de conformidad con lo que se determine al otorgarse el Registro Sanitario. Es de aplicación a los productos terapéuticos naturales de uso en salud, lo dispuesto en el primer párrafo del artículo 40° del presente Reglamento.

**Artículo 89°.-** Los productos terapéuticos naturales de uso en salud podrán combinarse con sustancias químicas que tengan actividad biológica definida, previa opinión favorable del Comité Especializado del Ministerio de Salud o quien haga sus veces. Los productos terapéuticos naturales de uso en salud no deberán incluir en su formulación sustancias estupefacientes o psicotrópicas de origen sintético, ni medicamentos alopáticos, hormonas animales o humanas u otras sustancias que contengan actividad hormonal o antihormonal o cualquier otra que represente riesgo para la salud.

**Artículo 90°.-** Para la autorización de comercialización de productos terapéuticos naturales de uso en salud que contengan asociaciones de sustancias activas deberá solicitarse previamente la opinión del Comité Especializado del Ministerio de Salud o quien realice sus funciones.

**Artículo 91°.-** Sólo se aceptarán los excipientes o aditivos que sean necesarios y complementarios para la elaboración de los productos terapéuticos naturales de uso en salud.

**Artículo 92°.-** La indicación propuesta para el uso de un producto terapéutico natural debe corresponder con las acciones y propiedades de los recursos naturales que se encuentren en su fórmula cualitativa y cuantitativa. Cuando el producto no tenga estudios clínicos terminados, se deberá consignar en los rotulados la frase: "TRADICIONALMENTE USADO PARA .....".

**Artículo 93°.-** Los productos terapéuticos naturales de uso en salud podrán utilizar para su identificación, nombre comercial y/o nombre común que esté en relación con los recursos naturales empleados en su fórmula y que no induzcan o sugieran el uso indebido del producto.

**Artículo 94°.-** No se consideran productos terapéuticos naturales de uso en salud, los complejos vitamínicos o las mezclas de vitaminas, aminoácidos, oligoelementos y proteínas.

**Artículo 95°.-** El cambio de composición en las sustancias activas del producto terapéutico natural de uso en salud requiere de nuevo Registro Sanitario. El cambio de composición en los excipientes de producto terapéutico natural de uso en salud, no requiere nuevo Registro Sanitario. Los cambios de las demás condiciones bajo las cuales se otorgó el Registro Sanitario, se rige por lo dispuesto en los artículos 49°, 50°, 51° y 53° del presente Reglamento.

**Artículo 96°.-** La codificación del Registro Sanitario para productos terapéuticos naturales de uso en salud se hará de la manera siguiente:

PTNN0000 : Producto terapéutico natural nacional.

PTNE0000 : Producto terapéutico natural extranjero.

**Artículo 97°.-** Para la inscripción en el Registro Sanitario se deberá presentar una solicitud con carácter de Declaración Jurada, suscrita por el representante legal de la empresa solicitante y por el químico farmacéutico responsable, en la que se deberá consignar la información general prevista en el artículo 55° del presente Reglamento, e incluir la información técnica siguiente:

a) Fórmula cualitativa y cuantitativa del producto terapéutico natural de uso en salud, expresando por separado la cantidad de la sustancia activa y los excipientes:

a.1) En el caso de extractos y tinturas, deberá indicarse el solvente utilizado y la proporción entre el peso del recurso terapéutico natural y el volumen de dicho solvente. a.2) En el caso de tabletas, grageas, cápsulas y similares deberá expresarse por unidad en forma de presentación dosificada.

a.3) Si es una composición líquida, deberá expresarse por cada 100 mililitros o dosis posológica.

a.4) Si se trata de gotas, deberá expresarse por cada mililitro.

a.5) En el caso de polvos, ungüentos, cremas y similares, deberá expresarse por cada 100 gramos.

a.6) Si se trata de suspensión, deberá expresarse por gramos de polvo necesarios para su reconstitución a 100 mililitros.

b) Clasificación taxonómica del recurso terapéutico natural, según corresponda.

c) Forma farmacéutica.

d) Forma de presentación.

e) Vía de administración.

f) Dosificación.

g) Uso recomendado.

h) Material y tipo de envase mediato e inmediato.

i) Sistema de codificación utilizado del número de lote, tratándose de producto importado.

j) Tiempo de vida útil.

k) Condición de venta.

**Artículo 98°.-** Adjunta a la solicitud, el interesado deberá presentar la documentación siguiente:

a) Protocolo de Análisis, del producto terminado incluyendo el control físico – químico, y microbiológico, especificaciones técnicas, resultados y método analítico

b) Proyecto de rotulado del envase mediato e inmediato, incluyendo el inserto o prospecto, cuando se trate de venta con receta médica.

c) Certificado de Libre Comercialización emitido por la autoridad competente, si el producto es importado.

d) Monografía que contenga la descripción botánica (en el caso de recursos vegetales), identificación taxonómica y estudios clínicos y/o literatura científica que respalden el uso recomendado, dosificación, contraindicaciones y precauciones.

e) Comprobante de pago por concepto de registro.

Para la reinscripción del Registro Sanitario, se presentará lo dispuesto en la información general del artículo 55° del presente Reglamento, adjuntando a la solicitud lo dispuesto en los numerales c) y e) del presente artículo.

**Artículo 99°.-** Para el caso de los productos terapéuticos naturales que contengan en su composición recursos de origen vegetal deberá incluir el ensayo de determinación de metales pesados en el protocolo de análisis de producto terminado o en el de la materia prima.

**Artículo 100°.-** El rotulado de los envases mediano e inmediato de los productos terapéuticos naturales de uso en salud deberá consignar lo siguiente:

- a) Nombre de marca y/o común o científico del producto.
- b) Forma farmacéutica.
- c) Composición cualitativa y expresión cuantitativa en peso del recurso terapéutico natural utilizado, usando el sistema centesimal, según la forma farmacéutica.
- d) Vía de administración.
- e) Contraindicaciones y advertencias, si tuviese.
- f) Contenido neto por envase.
- g) Nombre y país del laboratorio fabricante.
- h) Número de lote y fecha de expiración o vencimiento.
- i) Se deberá consignar las siguientes leyendas: "Manténgase fuera del alcance de los niños" y, cuando corresponda, "Guardar en lugar fresco y seco", adicionalmente y cuando sea necesario "Protéjase de la luz".
- j) Nombre, dirección del importador, Registro único de Contribuyente y nombre del químico farmacéutico responsable, para los productos importados.
- k) Uso tradicional recomendado.
- l) Dosificación y frecuencia de administración.
- m) Número de Registro Sanitario.
- n) Condición de venta.

Los productos terapéuticos naturales importados de uso en salud, cuyo rotulado no contenga los requisitos antes descritos, podrán adherir etiquetas acompañando la información solicitada, la misma que no debe cubrir los datos impresos en el rotulado.

Los envases inmediatos que por su tamaño no puedan contener toda la información a que se refiere la presente disposición podrán consignar cuando menos la información a que se refieren los literales a), b), d), g), h), y l).

En los folios o blisters se deberá consignar:

- a) Nombre del producto.
- b) Nombre o razón social o logotipo que identifique al laboratorio fabricante y/o al titular del Registro Sanitario.
- c) Número de lote y fecha de vencimiento.

**Artículo 101°.-** Los rotulados de los productos terapéuticos naturales de uso en salud de venta con receta médica no deberán contener información relativa a uso recomendado, dosificación y frecuencia de administración.

**Artículo 102°.-** El prospecto o inserto del producto terapéutico natural de uso en salud deberá consignar la información siguiente:

- a) Nombre del producto.
- b) Composición.
- c) Uso tradicional recomendado.
- d) Cuando corresponda: interacciones con otros productos, contraindicaciones, precauciones, reacciones adversas y advertencias.
- e) Dosificación y vía de administración.
- f) Condiciones de almacenamiento.

