

PRODUCTO NATURAL

Validación del método de determinación de flavonoides en tabletas de *Passiflora incarnata* L.

Validation of flavonoid quantification method in *Passiflora incarnata* L. tablets

Raúl Nápoles López,^I Jesús Rafael Rodríguez Amado,^{II} Maricel Rodríguez Antomachi,^I Ariadna Lafourcade Prada^{II}

^I Laboratorio Farmacéutico Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

^{II} Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: validar el método de cuantificación de flavonoides en las tabletas de *Passiflora incarnata* L., utilizando como patrón quercetina.

Métodos: se evaluó la especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez según las recomendaciones de la USP 30 y el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).

Resultados: en las condiciones practicadas en este trabajo el método es selectivo; resultó lineal en un rango de 60 a 140 % de concentración de flavonoides. Mostró exactitud y precisión con coeficiente de variación global de 0,67 %. No varió significativamente cuando se modificaron las condiciones de análisis.

Conclusiones: el método analítico, en las condiciones practicadas, es fiable y permite obtener resultados apropiados para el uso que se pretende.

Palabras clave: validación, flavonoides, *Passiflora incarnata* L.

ABSTRACT

Introduction: to validate the flavonoid quantification method on *Passiflora incarnata* L. tablets by using quercetine as standard.

Methods: selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness were evaluated, using USP 30 and the regulations of the Center for the State Control of Drug Quality (CECMED).

Results: under the conditions of this study, the method is selective, linear in a range of 60 to 140 % of flavonoid concentration. It showed accuracy and precision with global relative standard deviation of 0.67 %. The results did not significantly vary when the analytical conditions changed.

Conclusions: under the established conditions, this method is reliable and allows obtaining appropriate results for the intended use.

Key words: validation, flavonoids, *Passiflora incarnata* L.

INTRODUCCIÓN

La *Passiflora incarnata* L. comúnmente conocida por pasiflora, pasionaria o flor de la pasión, es una planta nativa de América Continental desde donde fue introducida en Cuba. Las partes empleadas tradicionalmente son las hojas y las flores.¹ Es utilizada por la población caribeña para el tratamiento de la ansiedad, la excitación nerviosa, el insomnio, los trastornos menopáusicos y las taquicardias.¹

Entre los metabolitos secundarios encontrados en las hojas de esta planta están flavonoides, alcaloides indólicos, heterósidos cianogenéticos como la ginocardina y se ha informado la presencia de aceite esencial.²

La hoja de esta especie es una droga oficial en la Farmacopea Británica,³ y la Farmacopea Italiana.⁴ En estas aparecen monografías para el control de calidad de la droga cruda, donde se indica la determinación de flavonoides. La acción sedante de esta planta se atribuye a un sinergismo entre los alcaloides, el maltol y los flavonoides. La actividad miorrelajante y antiespasmódica gastrointestinal, se atribuye al maltol y los flavonoides, respectivamente.²

En el mundo, se comercializan varias formas farmacéuticas a partir de extractos de la especie *Passiflora incarnata* L. En Cuba se informa el uso etnobotánico en forma de decocción,¹ el extracto fluido y el jarabe al 10 %.⁵

En el Laboratorio Farmacéutico Oriente (LFO) se ha desarrollado una formulación de tabletas, con propiedades sedantes, que utiliza como principio activo las hojas secas y pulverizadas de *Passiflora incarnata* L. Por esto, se hace necesario el establecimiento de un método analítico, para el control de la calidad de esta preparación por lo que el objetivo de este trabajo es validar un método espectrofotométrico para el control de la calidad de las tabletas de *Passiflora incarnata* L.

MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se utilizó la droga seca y molida, procedente de la Finca de Producción de Plantas Medicinales "La Sierrita", del productor Gallego Otero, provincia Cienfuegos, Cuba.

TABLETAS DE PASIFLORA

Las tabletas se obtuvieron por el método de granulación húmeda.^{6,7} Se utilizó como principio activo el polvo seco de las hojas de la planta y como excipientes tecnológicos dióxido de silicio coloidal (Aerosil V-200, Degussa, Bélgica), celulosa microcristalina (Microcel, Blanver, Brasil), lactosa monohidratada (DMV, Holanda), polivinilpirrolidona (Kollidon 25, BASF, Alemania) y estearato de magnesio (N/M, China).

ENSAYO DE FLAVONOIDES

Toma de muestra

Para la evaluación de los flavonoides en las tabletas, se determinó el peso promedio de 20 tabletas de pasiflora. Se trituraron hasta polvo fino en un mortero y se pesó una masa equivalente a 0,200 g del principio activo (droga seca). Para la droga seca en polvo, se pesó directamente 0,200 g.

Tratamiento de la muestra

Se introdujo en un balón de 100 mL, la cantidad pesada de muestra. Se agregaron 40 mL de etanol al 60 % v/v. Se colocó el condensador y se reflujo en baño termostático (MYL, Rusia) a 60 °C durante 30 min agitando frecuentemente. Se dejó enfriar y se filtró la mezcla a través de algodón hidrófilo, recogiendo el filtrado en un frasco volumétrico de 100 mL. Se devolvió el algodón hidrófilo con el residuo, al balón utilizado inicialmente. Se agregaron 40 mL más de la solución de etanol 60 % v/v y se reflujo en las mismas condiciones durante 10 min. Se dejó enfriar y se filtró la mezcla a través de papel, sobre el frasco volumétrico que recogió el filtrado la primera vez. Se enrasó el volumétrico con la solución de etanol 60 % v/v.³

Preparación de la muestra

Se toman 5,0 mL de esta última solución y se llevaron a un balón de 50 mL. Se evapora a sequedad bajo presión reducida, utilizando un rotoevaporador (Kika Werke, Alemania). Se redisolvió el residuo con 10 mL de una solución de metanol y ácido acético glacial en proporción 1:10 (ambos Riedel de Haiën, Alemania) y se transfirieron a un volumétrico de 25 mL. Se agregaron 10 mL de una solución de ácido bórico (25,0 g) y ácido oxálico (20,0 g) disueltos en un litro de ácido fórmico anhidro (Riedel-de Haiën, Alemania). Se enrasó hasta 25,0 mL con ácido acético anhidro.³ Se dejó reposar 45 min y se leyó la absorbancia a 439 nm.

Preparación de la solución de referencia de quercetina 8 µg/mL

Se pesaron 0,05 g de quercetina (Merck, USA) y se disuelven en 100 mL de una solución de etanol al 60 %v/v. Se tomaron 20 mL y se trasvasaron a un frasco volumétrico de 50 mL y se completó el volumen con la solución hidroalcohólica 60 %. De esta última se tomaron 10 mL y se transfirieron a un balón de 50 mL. Se evaporó a sequedad bajo presión reducida utilizando un rotoevaporador (Kika Werke, Alemania). Se redisolvió el residuo con 10 mL de la solución de metanol y ácido acético glacial y se trasvasaron a un volumétrico de 25 mL. Seguidamente se agregaron 10 mL de la solución de ácido bórico y oxálico en ácido fórmico anhidro y se enrasó utilizando ácido acético anhidro. Se dejó reposar por 45 min antes de leer la absorbancia.

Preparación del blanco

En un kitasato, se introdujeron 10,0 mL de una solución de quercetina (Merck, Alemania) en etanol 96 %; de concentración 8 µg/mL. Se evaporó a sequedad bajo presión reducida. Se redisolvió el residuo con 10 mL de una solución de metanol y ácido acético glacial. Se agregaron 10 mL de ácido fórmico anhidro y se enrasó hasta 25 mL con ácido acético anhidro. Se dejó reposar 45 min antes de leer la absorbancia.

Se calculó el contenido de flavonoides en microgramos utilizando la fórmula siguiente:

$$C = \frac{A_m P_s 80}{A_p p_m}$$

donde: A_m , absorbancia de la muestra; A_p , absorbancia del patrón; p_m y p_s , pesada de la muestra y del patrón en gramos; 80, factor matemático.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Evaluación de la especificidad

Se analizó un placebo, mezclando todos los excipientes en las mismas proporciones en que están presentes en la tableta. Se evaluó la solución patrón de quercetina 8 µg/mL y la droga seca. Se analizaron además dos muestras preparadas adicionando al placebo la droga seca (0,200 g) y otra adicionándole 1 mL de la solución patrón quercetina 8 µg/mL. Los análisis se realizaron por quintuplicado. Se determinó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación del factor respuesta en todas las muestras preparadas y en el placebo. Se realizó un análisis de varianza y una prueba HSD de Tukey, para evaluar diferencias entre las medias.

Los criterios de aceptación fueron que la absorbancia del placebo en la región de trabajo no fuera significativa. No debe haber diferencias estadísticas significativas entre las medias de la absorbancia del placebo enriquecido con la droga seca y la muestra de droga seca, ni entre las medias del placebo enriquecido con quercetina y la muestra que contiene quercetina solamente.^{8,9}

Evaluación de la linealidad

Se realizó con el empleo de cinco niveles de muestra. Se tomó como el 100 %, la cantidad de 0,200 g, que es la que se emplea para el análisis rutinario. Se pesaron cantidades de muestras equivalentes a 60, 80, 100, 120 y 140 %. Se midió la absorbancia por quintuplicado en cada nivel. Se realizó un análisis de regresión simple, por el método de los mínimos cuadrados, entre las variables cantidad añadida vs. cantidad recuperada. Se calculó el porcentaje de recuperación, así como el coeficiente de variación del factor respuesta en cada nivel. Se realizó un contraste de varianzas para evaluar homocedasticidad en todos los niveles de adición.^{9,10}

Los criterios de aceptación para linealidad fueron: desviación estándar relativa en cada nivel ≤ 5 %; análisis de varianza no significativo; coeficiente de correlación (R) $> 0,99$; coeficiente de determinación (R²) $> 0,98$; intercepto significativamente igual a cero; pendiente significativamente igual a 1; recuperación en cada nivel entre 97-103 %.^{8,9}

Evaluación de la exactitud

Como se trata de una matriz muy compleja, en la que por un lado, están los excipientes tecnológicos presentes en la formulación y por el otro, la droga seca, dentro de la cual se encuentran los flavonoides, en este trabajo se verificó la exactitud de dos modos diferentes.

Método de adición de estándar. Se pesaron para analizar, 6 muestras de polvo de tabletas equivalentes a 0,200 g de la droga seca. Se añadió a cada una de ellas cantidades crecientes de la solución de quercetina (0, 2, 4, 6, 8, 10 μg). Se aplicó el método analítico y se determinó la cantidad de flavonoides en cada una por quintuplicado.

Los criterios de aceptación fueron: R $> 0,999$; R² $> 0,98$; intercepto estadísticamente igual al valor de recuperación de la muestra sin adición de patrón; pendiente $> 0,95$ y estadísticamente igual a 1.^{8,9}

Método de placebo enriquecido con muestra. Se preparó un placebo, mezclando todos los excipientes en las proporciones en que estos están presentes en la formulación. Se le añadió a este, cantidades crecientes de la droga seca: 80, 100 y 120 % (160, 200 y 240 mg, respectivamente). Se determinó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación en cada nivel de adición. Se realizó un contraste de varianzas (prueba de Cochran). Se tomaron como criterios de exactitud que el coeficiente de variación en cada nivel fuera menor del 3 % y que la prueba de Cochran fuera no significativa.^{8,9}

Evaluación de la precisión

Repetibilidad. Se tomaron de las muestras preparadas para el *test* de linealidad, los niveles de concentración 60, 100 y 140 %. Se realizó un contraste de varianza (*test* de Levene) para evaluar posibles diferencias entre las desviaciones estándar en los tres de niveles. Se tomaron como criterios que el coeficiente de variación global de los tres niveles fuera menor de 1,5 % y que el contraste de varianza fuera no significativo.^{8,9}

Reproducibilidad. Se evaluó utilizando dos analistas, el mismo día, en el mismo equipo, pero a dos temperaturas diferentes, 25 ± 2 °C y 33 ± 2 °C. Se realizó un análisis factorial para evaluar las posibles diferencias en todas las variantes posibles. Se tomó como criterio de aceptación que no existiera diferencia significativa entre las medias, ni en las desviaciones estándar en las combinaciones posibles de los factores ($p > 0,05$).^{8,9}

Evaluación de la robustez

Se evaluó el efecto del tiempo de preparación del reactivo desarrollador de color, sobre la respuesta del método.

La literatura plantea que este no debe utilizarse después de 15 días.³ En este trabajo se evaluó la solución recién preparada y 10 días después de preparada, en dos laboratorios diferentes. En ambos se trabajó a temperatura ambiente (32 °C) el día 1 y 33 °C el día 10. Se realizó un análisis factorial para evaluar las posibles diferencias en todas las variantes posibles. Se tomó como criterio de aceptación que no existiera diferencia estadística significativa entre las medias ($p > 0,05$).^{8,9}

Los resultados obtenidos fueron procesados con el software StatGraphics Plus (v.5.1, StatEase Co., MA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

La [figura 1](#) presenta el espectro de absorción del placebo, una vez que se aplicó a este el procedimiento analítico para el desarrollo de color. La absorbancia obtenida a la longitud de onda de trabajo (439 nm) fue igual a cero. El análisis de varianza ([tabla](#)) mostró diferencias significativas entre las medias de la absorbancia de las muestras evaluadas. La prueba de rangos múltiples, empleando la distancia francamente significativa (HSD, siglas en inglés) de Tukey ([Fig. 2](#)) muestra que la absorbancia del placebo más quercetina no fue diferente estadísticamente, de la absorbancia de la quercetina. De igual modo, la absorbancia del placebo más la droga seca, no fue diferente estadísticamente, de la absorbancia de la droga seca. Estos resultados indican que ni los excipientes tecnológicos, ni el material vegetal donde están contenidos los flavonoides, afectan la respuesta del método.⁸⁻¹⁰

LINEALIDAD DEL MÉTODO

En todos los niveles de concentración utilizados, los valores de coeficiente de variación fueron menores de 1,5 %, valores por debajo del que plantea la literatura (5 %).^{8,10} El análisis de varianza mostró homocedasticidad en todos los niveles. El nivel de concentración no afectó la respuesta del método, en el intervalo estudiado. Se obtuvo una magnífica recuperación entre el 98,72 y el 101,44 %. Los estadísticos R y R² de la regresión fueron satisfactorios ([tabla](#), [Fig. 3](#)). De igual modo la pendiente fue estadísticamente igual a 1 y el intercepto estadísticamente igual a 0. Estos datos confirman que el método es lineal en el intervalo de concentraciones evaluado.⁸⁻¹⁰

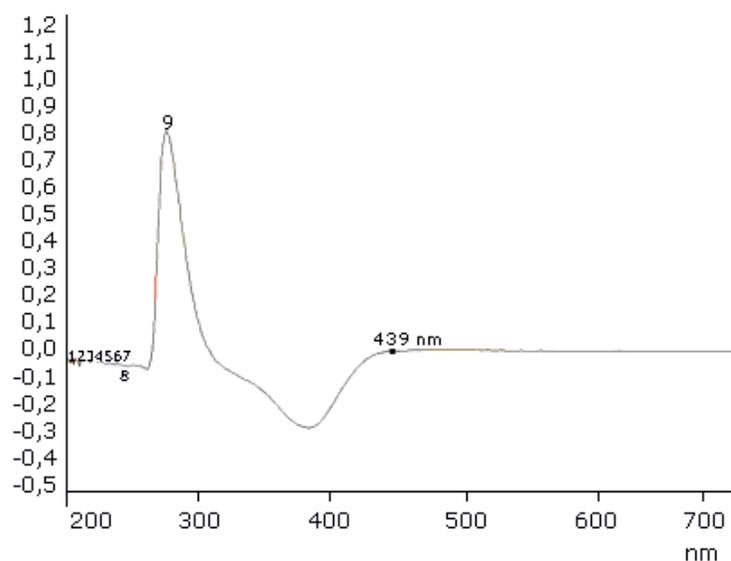


Fig. 1. Espectro de absorción del placebo.

Tabla. Resultados de la evaluación de los parámetros de validación

Parámetro	Prueba realizada	Valor	Criterio ^{7,8}
Selectividad	Absorbancia del placebo	0,0000	= 0
Linealidad	Recuperación (%)	100 ± 1,09	100 ± 3
	Cv	1,30	≤ 5 %
	Regresión	Cr= -0,092 + 1,0138*Ca	Y= mx + b
	R	0,9993	> 0,99
	R ²	0,9980	> 0,98
	Intercepto (prueba t)	t= -0,5465; p= 0,6227	p> 0,05
	Pendiente (prueba t)	t= 0,6174; p= 0,5807	p> 0,05
Exactitud	Adición de estándar		
	Prueba de Cochran	C= 0,4698; p= 0,6826	p>0,05
	Regresión	Cr= 7,26 + 1,009*Ca	Y= mx + b
	R	0,9999	> 0,99
	R ²	0,9998	> 0,98
	Significación del intercepto	t= 0,9092; p= 0,4147	= 7,24 ug
	Pendiente	1,009	> 0,95
	Significación de la pendiente	t= 1,8963; p= 0,1308	= 1
	CV _{global}	0,67 %	< 3 %
	Recuperación (%)	97-103 %	97-103 %
	Placebo enriquecido		
CV _{global}	0,67 %	< 3 %	
Prueba de Cochran	C= 0,4698; p= 0,6826	p> 0,05	
Precisión	Repetibilidad		
	CV	0,67 %	p>1,5 %
	Análisis de varianza	F= 0,3670; p=0,7003	p> 0,05
	Reproducibilidad		
Análisis de varianza	F= 1,3246; p = 0,7653	p> 0,05	
Robustez	Análisis de varianza	F= 0,70; p= 0,5114	p> 0,05

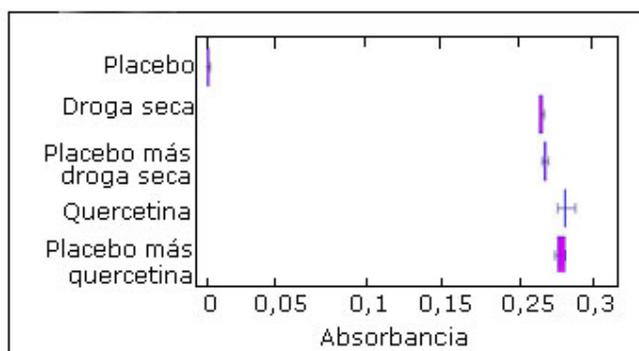


Fig. 2. Gráfico de medias obtenido en la evaluación de la selectividad. Prueba de la distancia francamente significativa (HSD) de Tukey.

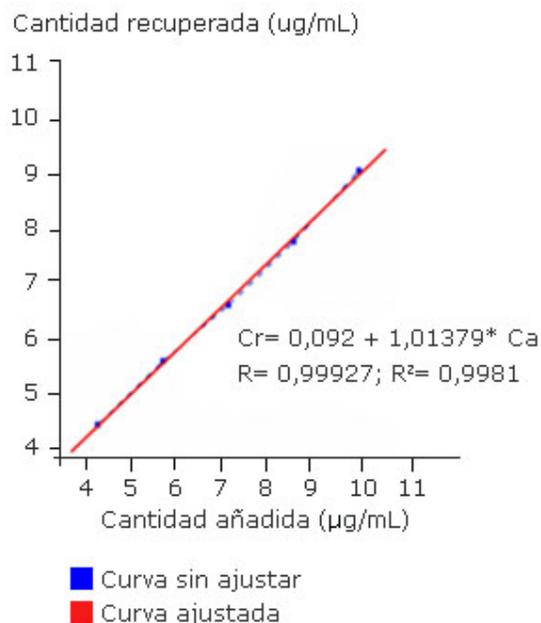


Fig. 3. Gráfico de regresión ajustado para linealidad del método.

EXACTITUD DEL MÉTODO

Los valores de recuperación encontrados, por el *método de adición de estándar*, estuvieron entre 100,83 y 103,00. Se obtuvieron magníficos valores de R y R^2 (tabla). El intercepto fue significativamente igual a la cantidad recuperada de la muestra sin adición de patrón (7,24 μg) (Fig. 4), elemento imprescindible para verificar la exactitud por este método.⁸⁻¹⁰ Se obtuvo una pendiente estadísticamente igual a 1. Todos los criterios evaluados cumplen los criterios de aceptación informados en la literatura para este parámetro.⁸⁻¹⁰

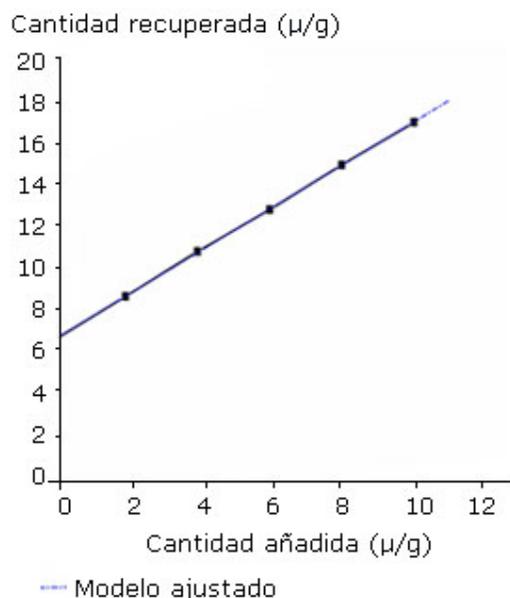


Fig. 4. Recta de regresión ajustada para la evaluación de la exactitud.

Al evaluar la exactitud por el *método de placebo enriquecido* con muestra, se observó que el coeficiente de variación; en todos los niveles; estaba por debajo del 3 %. La prueba de Cochran evidenció que no existen diferencias estadísticas significativas entre las desviaciones estándar en los niveles evaluados.

Estos resultados, conjuntamente con los de la evaluación por el método de adición de estándar, demuestran que el método permite determinar con exactitud el contenido de flavonoides en las muestras de ensayo, en el intervalo y en las condiciones de trabajo estudiadas.⁸⁻¹⁰

PRECISIÓN DEL MÉTODO

Al evaluar la precisión como *repetibilidad*, se obtuvo en los tres niveles de concentración un coeficiente de variación < 1,30 %. El coeficiente de variación global fue de 0,67 %. Este valor concuerda con los expresados como criterios de aceptación (1,50 %).⁸⁻¹⁰ El análisis de varianza mostró un valor de la prueba de Levene igual a 0,3670 con p valor igual a 0,7003, lo que indica que no existen diferencias estadísticas significativas entre los valores de desviación estándar en los tres niveles de concentración evaluados.

Al evaluar la reproducibilidad no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las medias recuperadas por ambos analistas, en el mismo valor de temperatura ($t = -0,5878$; $p = 0,5697$), ni por el mismo analista en valores de temperaturas diferentes ($t = -0,4164$; $p = 0,6859$).

Los resultados obtenidos en los ensayos de repetibilidad y de reproducibilidad permiten afirmar que la respuesta del método no se afecta por los cambios introducidos. El método cumple con los requisitos establecidos en la literatura especializada, y por tanto, es preciso.⁸⁻¹⁰

ROBUSTEZ DEL MÉTODO

La robustez de un método analítico es la resistencia al cambio en los resultados obtenidos por un método, cuando se realizan desviaciones menores a partir de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento.^{9,10} El análisis factorial realizado, mostró que no existen diferencias estadísticas significativas entre las medias recuperadas en todas las combinaciones posibles de los factores con p valor de la prueba $F > 0,05$.

Se concluye que el método espectrofotométrico para la determinación de flavonoides, utilizando quercetina como sustancia de referencia, es fiable en las condiciones experimentales evaluadas y permite determinar con precisión y exactitud el contenido de polifenoles presentes en las tabletas de *Passiflora incarnata* L.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig JT. Plantas Medicinales, Aromáticas y Venenosas de Cuba. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 1988. p. 888.
2. Arteché G, Vanaclocha V, Güenechea S. Vademécum de prescripción de plantas medicinales. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 1999.
3. British Pharmacopoeia Commission. Londres: Her Majesty Stationary Office; 2010.
4. Italian Herbal Pharmacopoeia. Roma: Italian Herbal Association; 1995: p. 241.
5. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Dirección Nacional de Farmacias. Formulario Nacional de Fito y Apifármacos (FINFA). La Habana: Ministerio de Salud Pública de Cuba; 2010. p. 50-2.
6. Iraizoz CA, Bilbao RO, Barrios MA. Conferencias de Tecnología Farmacéutica II. La Habana: IFAL. Universidad de La Habana; 1992.
7. Lemus R MZ, Chong QA. Desarrollo tecnológico de un producto natural de acción sedante: comprimidos de Pasiflora. Rev CENIC Ciencias Quím. 2009; 40(2): 101-3.
8. CECMED. Regulación No. 41. Validación de métodos analíticos. La Habana: Ministerio de Salud Pública de Cuba; 2007.
9. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Firts English Edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.

Recibido: 23 de octubre de 2013.

Aprobado: 8 de diciembre de 2013.

Raúl Nápoles López. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente.
Avenida Patricio Lumumba, s/n. Santiago de Cuba, Cuba. Correo electrónico:
raul@lfo.quimeda.cu