



Desarrollo y validación de un método analítico por espectrofotometría UV/VIS, para la cuantificación de polifenoles en la materia prima ortiga.

Natalia Serna Echeverri

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Tutor

Juan Carlos Quintero Díaz, Ph D. en Ingeniería Química y Ambiental

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Bioquímica
El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia
2022

Cita	(Serna Echeverri, 2022)
Referencia	Serna Echeverri, N. (2022). <i>Desarrollo y validación de un método analítico por espectrofotometría UV/VIS, para la cuantificación de polifenoles en la materia prima ortiga</i> . [Trabajo de grado]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla.

Jefe departamento: Lina María González Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A Dios, a mi familia y a Pablo.

Tabla de contenido

Resumen.....	10
Abstract.....	11
Introducción	12
1 Objetivos	14
1.1 Objetivo general	14
1.2 Objetivos específicos	14
2 Marco teórico	15
2.1 Generalidades de la ortiga (Urtica dioica).....	15
2.2 Polifenoles	17
2.3 Validación.....	18
2.4 Validación de métodos analíticos	18
2.4.1. Linealidad	19
2.4.2. Selectividad.....	19
2.4.3. Precisión	19
2.4.4. Exactitud.....	20
2.5 Espectrofotometría UV/VIS.	20
3 Metodología	22
3.1 Desarrollo del método	22
3.1.1 Muestra de ortiga.....	22
3.1.2 Preparación de extracto para la determinación de fenoles totales	22
3.1.3 Preparación del carbonato de calcio al 20% p/v	22
3.1.4 Preparación de la solución madre del estándar de ácido gálico.....	22
3.1.5 Preparación del reactivo folin	23
3.2 Validación del método de cuantificación de polifenoles	23

3.2.1	Preparación de las muestras para las lecturas en el espectrofotómetro	23
3.2.2	Preparación del blanco utilizado para las lecturas en el espectrofotómetro	23
3.2.3	Selección de longitud de onda	23
3.2.4	Selectividad.....	24
3.2.5	Linealidad	24
3.2.6	Precisión	25
3.2.7	Exactitud.....	25
4	Resultados y discusión.....	26
4.1	Barridos espectrales y selección de longitud de onda.....	26
4.2	Selectividad	27
4.2.1	Cálculos de las relaciones selectivas	28
4.3	Linealidad.....	28
4.3.1	Datos de la prueba de hipótesis para la pendiente y el intercepto	31
4.4	Precisión	36
4.4.1	Repetibilidad	36
4.4.2	Precisión intermedia:	38
4.5	Exactitud	41
4.5.1	Exactitud ácido gálico:.....	41
4.5.2	Exactitud ortiga:	43
5	Conclusiones	45
6	Recomendaciones	46
	Referencias.....	47

Lista de tablas

Tabla 1. Datos primarios obtenidos de la prueba de selectividad	27
Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos para la prueba de linealidad con el estándar ácido gálico.	29
Tabla 3. Coeficientes del modelo de regresión lineal.	29
Tabla 4. Análisis de varianza por ANOVA	29
Tabla 5. Datos calculados para las pruebas de hipótesis.	31
Tabla 6. Intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto al 95,0% de confianza.	34
Tabla 7. Datos calculados para los factores de respuesta (ppm/Abs).....	35
Tabla 8. Resumen estadístico para los factores de respuesta	35
Tabla 9. Prueba de normalidad para factores de respuesta.	35
Tabla 10. Datos obtenidos para la prueba de repetibilidad.	36
Tabla 11. Resumen estadístico para el ácido gálico (15,0 ppm) y para la ortiga (100 mg) respectivamente.....	37
Tabla 12. Datos obtenidos en el ensayo de precisión intermedia para el ácido gálico.....	38
Tabla 13. Resumen estudio R&R por el método de varianza para el ácido gálico.	38
Tabla 14. ANOVA análisis de varianza estudio R&R para el ácido gálico	38
Tabla 15. Datos obtenidos en el ensayo de precisión intermedia para la ortiga.	39
Tabla 16. Resumen estudio R&R por el método de varianza para las muestras de ortiga.	40
Tabla 17. ANOVA análisis de varianza estudio R&R para las muestras de ortiga.	40
Tabla 18. Datos obtenidos en la exactitud para el ácido gálico.	41
Tabla 19. Resumen estadístico de la prueba de exactitud del ácido gálico.	41
Tabla 20. ANOVA para absorbancia por concentración del ácido gálico	42
Tabla 21. Verificación de la varianza test de C de Cochran en la prueba de exactitud del ácido gálico.	42
Tabla 22. Datos obtenidos para la exactitud de la muestra de ortiga.	43

Tabla 23. Resumen estadístico para la prueba de exactitud de la muestra de ortiga.....	43
Tabla 24. ANOVA para absorbancia por mg de ortiga.	44
Tabla 25. Verificación de la varianza test de C de Cochran en la prueba de exactitud de la muestra de ortiga.	44

Lista de figuras

Figura 1. Ortiga Mayor (<i>Urtica Dioca</i>).....	16
Figura 2. Compuestos orgánicos presentes en la ortiga.....	16
Figura 3. Estructura química de compuestos fenólicos simples.	17
Figura 4. Espectrofotómetro UV/VIS.....	20
Figura 5. <i>Barridos espectrales</i>	26
Figura 6. Barrido espectral del blanco.....	27
Figura 7. Intensidad de color	28
Figura 8. Modelo de regresión lineal para el ácido gálico.....	30
Figura 9. Secuencias o comportamiento de los analistas para los tres niveles de concentración de ácido gálico.	39
Figura 10. Secuencias o comportamiento de los analistas para los tres diferentes pesos de las muestras de ortiga.....	40

Siglas, acrónimos y abreviaturas

PF	Polifenoles
CF	Compuestos fenólicos

Resumen

Los polifenoles constituyen una gran clase de sustancias con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividades biológicas, son reconocidos por su remarcada capacidad antioxidante. Por esta razón, Laboratorios Medick, como una compañía cuya principal actividad es fabricar y comercializar productos a base de sustancias de origen natural, observó la importancia de contar con un método validado para la cuantificación de los polifenoles totales dentro de su portafolio de métodos analíticos de manera que se pueda asegurar la calidad de la materia prima Ortiga en polvo. Los resultados obtenidos en las pruebas de selectividad, linealidad, selectividad, precisión y exactitud mostraron que la metodología propuesta es confiable.

Palabras clave: ortiga, polifenoles, validación, espectrofotometría UV/VIS

Abstract

Polyphenols constitute a large class of substances with different structures, chemical properties and biological activities, and are recognized for their remarkable antioxidant capacity. For this reason, Laboratorios Medick, as a company whose main activity is to manufacture and commercialize products based on substances of natural origin, observed the importance of having a validated method for the quantification of total polyphenols within its portfolio of analytical methods in order to ensure the quality of the raw material Nettle powder. The results obtained in the selectivity, linearity, selectivity, precision and accuracy tests showed that the proposed methodology is reliable.

Keywords: nettle, polyphenols, validation, Ultraviolet-Visible spectrophotometry,

Introducción

Colombia, es un país privilegiado por la naturaleza, donde la diversidad de climas que se crean a través de grandes gradientes de altitud genera una variedad de ecosistemas representadas en punas, bosques de montaña, valles secos, desiertos altos y salinas, entre otras; paisajes que tienen diversidad de plantas y animales; está catalogado como uno de los países con la mayor diversidad en el mundo, precedidos solo por Brasil y seguidos por Indonesia, China y México (Bravo, K. & Pereañez, J. A., 2016). Colombia tiene 28.000 plantas y líquenes; siendo un patrimonio invaluable que puede brindarle ventajas competitivas en el descubrimiento y desarrollo de ingredientes activos para la industria farmacéutica y cosmética mediante el uso sostenible de su biodiversidad (Gyllenhaal, C., Quinn, M. L., & Soejarto, D. D. 1986). En Colombia el uso tradicional de plantas medicinales es ampliamente reconocido en los mercados populares, donde plantas silvestres se emplean para diversas dolencias (Giraldo Quintero et al., 2015), una de estas plantas es la ortiga (*Urtica dioica*) de la familia Urticaceae.

La ortiga tiene como característica poseer pelos urticantes que al tener contacto con la piel producen una lesión y provocan ronchas y escozor. Además, esta planta posee gran cantidad de compuestos orgánicos que tienen valor medicinal, incluidos carotenoides, flavonoides, minerales, ácidos orgánicos, mucilagos, taninos, polifenoles, polisacáridos, entre otros (Quisi Aragadovay, R. A. 2012).

Estos compuestos se encuentran principalmente en las hojas y en la raíz, por lo que se utilizan como depurativo de sangre, emenagogo, diurético, hemorragia nasal y menstrual, reumatismo, eccema, anemia, nefritis, hematuria, ictericia, menorragia y diarrea (Joshi, B. C., Mukhija, M., & Kalia, A. N. 2014).

Se ha informado que la planta tiene diversas actividades farmacológicas, como antioxidante, antiinflamatorio, antiulceroso, anticolitis, antiviral, anticanceroso, antibacteriano, antimicrobiano, antifúngico, antiandrogénico, insecticida, inmunomodulador, hipocolesterolémico, hipoglucemiante, efectos cardiovasculares, analgésico, natriurético, hipotensivo y hepatoprotector (Joshi, B. C., Mukhija, M., & Kalia, A. N. 2014).

Debido a estas diversas actividades farmacológicas ha sido una planta de gran importancia para empresas como Laboratorios Medick que es una compañía cuya principal actividad es fabricar y comercializar productos a base de sustancias de origen natural, en las líneas productivas de

Fitoterapéuticos, Suplementos Dietarios, Cosméticos y Alimentos. Empresa la cual tiene una política de calidad basada en el respeto a sus clientes, empleados y accionistas, y seguimiento de las normas legales vigentes para el sector farmacéutico en Colombia. La implementación permanente de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) permite a esta empresa tener estándares de calidad óptimos en la producción, que garantizan que los productos elaborados y comercializados alcancen los beneficios esperados por los consumidores. A partir de esta política nace la necesidad de identificar y cuantificar los compuestos orgánicos mencionados anteriormente por diferentes métodos analíticos, entre ellos la espectrofotometría UV/VIS.

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de polifenoles de la materia prima Ortiga.

1.2 Objetivos específicos

Desarrollar un método por espectrofotometría UV/VIS que cuantifique la cantidad de polifenoles de la ortiga.

Validar el método desarrollado para cuantificar los polifenoles presentes en la ortiga.

Cuantificar el contenido de polifenoles totales presentes en la ortiga.

2 Marco teórico

El uso de plantas medicinales con efectos curativos ha ido evolucionando desde las primeras formas utilizadas por los hombres como medio de aumentar las posibilidades de supervivencia y mejorar la salud. La OMS reconoció oficialmente la fitoterapia como método de tratamiento de enfermedades y condiciones médicas en 1978, además recomendó la importancia de la investigación en este campo debido a que todas las plantas medicinales tienen cientos y millones de metabolitos secundarios, que desarrollan efectos terapéuticos o tóxicos. Han sido necesarios los conocimientos químicos y farmacéuticos para garantizar la calidad y la seguridad de su uso. En otras palabras, como planta médica valorada e incluida en la farmacopea se requiere haber identificado su principio activo o haber quedado claro en un lenguaje farmacéutico (Fortes, C. S., Silva, C., & Camargo, E., 2015).

Cuando se desea liberar el producto farmacéutico recién elaborado o la materia prima para su elaboración, se pueden utilizar métodos analíticos simples y rápidos que garanticen la cuantificación del analito sin interferencias de los componentes de la matriz, lo cual requiere un análisis caso a caso. Los métodos por espectrofotometría UV/VIS directa son una opción disponible en cualquier laboratorio, siendo una alternativa simple y rápida, que no requiere de amplios recursos, lo cual no siempre ocurre con los cromatógrafos líquidos de alta resolución (Navarro, M. P., Hernández, Y. R., & Pérez, Y. S. 2014).

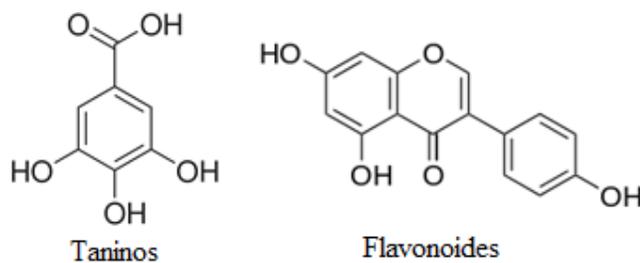
2.1 Generalidades de la ortiga (*Urtica dioica*)

Planta herbácea vivaz de hasta un metro de altura. De cepa ramificada con tallo erguido y cuadrangular. Hojas ovales opuestas dos a dos dispuestas por todo el tallo, con largo peciolo, acabadas en punta y bordes fuertemente dentados. De las axilas de estas hojas brotan, en la parte superior de los tallos, inflorescencias en forma de panículas. Son flores muy menudas, verde amarillosas con estambres amarillos, las masculinas con cuatro estambres y las femeninas en forma de bolita (el estigma). Sus frutos son aquenios (cápsulas). Toda la planta se cubre de pelillos urticantes, que se abren y al rozar con la piel vierten su contenido sobre la herida que producen, provocando un intenso escozor (Ciriza, J. H., 2007).

Figura 1. Ortiga Mayor (Urtica Dioca)

Nota. Fuente Renobales, J. (2001). Plantas de interés farmacéutico.

Esta planta posee gran cantidad de compuestos orgánicos que tienen valor medicinal, incluidos carotenoides, flavonoides, minerales, ácidos orgánicos, mucilagos, taninos, polifenoles, polisacáridos, entre otros (Quisi Aragadovay, R. A., 2012).

Figura 2. Compuestos orgánicos presentes en la ortiga.

Nota. Fuente <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Flavonoide&oldid=143870538>. (Flavonoide y compuestos orgánicos, 2004).

Estos compuestos se encuentran principalmente en las hojas y en la raíz, por lo que se utilizan como depurativo de sangre, emenagogo, diurético, hemorragia nasal y menstrual, reumatismo, eccema, anemia, nefritis, hematuria, ictericia, menorragia y diarrea (Joshi, B. C., Mukhija, M., & Kalia, A. N., 2014).

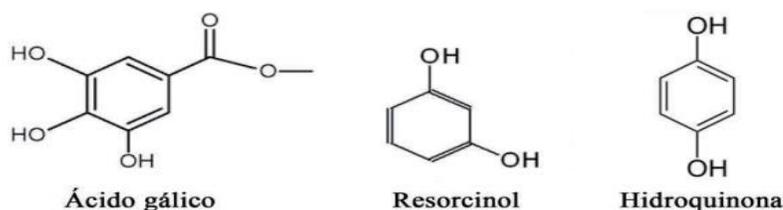
Se ha informado que la planta tiene diversas actividades farmacológicas, como antioxidante, antiinflamatorio, antiulceroso, anticolitis, antiviral, anticanceroso, antibacteriano, antimicrobiano, antifúngico, antiandrogénico, insecticida, inmunomodulador, hipocolesterolémico, hipoglucemiante, efectos cardiovasculares, analgésico, natriurético, hipotensivo y hepatoprotector (Joshi, B. C., Mukhija, M., & Kalia, A. N., 2014).

2.2 Polifenoles

Los polifenoles (PF) o compuestos fenólicos (CF) son moléculas naturales del metabolismo secundario de las plantas que derivan de las vías de shiquimato y de los fenilpropanoides. En el reino vegetal se encuentran ampliamente distribuidos, de hecho, las plantas sintetizan miles de CF diferentes (Valencia Avilés, E. et al., 2017).

Son objeto frecuente de investigación debido a sus diversas funciones como lo es la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente como la agresión por patógenos e insectos. Además de estas funciones, los PF son reconocidos por su remarcada capacidad antioxidante (Valencia Avilés, E. et al., 2017). Para estas investigaciones es utilizado comúnmente el método Folin-Ciocalteu.

Figura 3. Estructura química de compuestos fenólicos simples.



Nota. Fuente Portal, O. & Ramos, K. (2017). Metabolitos secundarios de las plantas.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W₈O₂₃) y molibdeno (Mo₈O₂₃), siendo

proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez, D., Ortiz, C. & Mendoza, A. 2008).

2.3 Validación

Desde mediados de los años setenta la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos propuso una serie de regulaciones de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) las cuales tienen a la validación de procesos como uno de los principales requisitos de calidad a cumplir para garantizar la satisfacción y seguridad del consumidor (Meza, J & Gutiérrez, M., 2006).

Las BPM están orientadas de manera principal a la disminución de riesgos inherentes a la producción farmacéutica. Dichos riesgos son esencialmente de dos tipos: contaminación cruzada (de un contaminante en particular o uno no esperado) y mezclas (confusiones) causada por ejemplo por un mal etiquetado de los envases (Colombia. Ministerio de salud y protección social, 2016).

En Colombia el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) es la entidad regulatoria que autoriza y controla la comercialización y fabricación de medicamentos y alimentos.

La validación no solamente se hace con el objetivo de cumplir requerimientos regulatorios sino también para evaluar completamente el proceso desde la carga de la materia prima hasta asegurarse que el producto cumple con las especificaciones predeterminadas y atributos de calidad lo cual influye directamente en su desempeño (Tarallo, S. C., 2021).

Validar procesos reducen costos, optimizan procesos, aseguran la calidad, además cumplen con los requerimientos regulatorios. El objetivo de la validación es que todo esté funcionando de manera correcta desde la fabricación de un nuevo producto.

2.4 Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es un paso fundamental que permite establecer la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos (AEFI, 2001).

Toda validación comienza a partir de un método ya aprobado y ajustado. La validación trata de demostrar que tanto el método de análisis como su sistema analítico producirán resultados adecuados. Dicha demostración debe ser documentada de la siguiente manera (ICH, 2005):

1. Protocolo de validación
2. Realización de la validación
3. Evaluación de resultados analíticos
4. Informe de validación.

Las validaciones constan de exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), linealidad y selectividad, y el cumplimiento de estos llevará a generar datos robustos y confiables.

2.4.1. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido; para el cumplimiento de este parámetro se necesita que los datos describan un comportamiento lineal cuando se hace una regresión de este tipo que relaciona las variables conocidas y del equipo (ICH,2015)

2.4.2. Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para medir e identificar simultánea o separadamente los analitos de interés en presencia de otras sustancias químicas (ICH,2015).

2.4.3. Precisión

La precisión de un método analítico muestra el grado de dispersión entre una serie de múltiples medidas desde una misma muestra homogénea. La realización de la toma de datos se lleva a cabo para obtener una desviación estándar menor y de esta manera determinar la variabilidad del método. La precisión se establece por medio de diferentes tipos de estudios como: la repetibilidad y precisión intermedia. Para la repetibilidad se estudia la variabilidad del método realizando una serie de análisis, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto; la

precisión intermedia de igual manera que la repetibilidad estudia la variabilidad del método, pero en condiciones operativas diferentes como: diferentes analistas, aparatos, días entre otros y en un mismo laboratorio (AEFI, 2001).

2.4.4. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta, ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado versus el valor encontrado (AEFI, 2001).

2.5 Espectrofotometría UV/VIS.

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Díaz, N. et al., 2006)

Figura 4. *Espectrofotómetro UV/VIS.*



Lo mencionado anteriormente está explicado por la Ley de Lambert-Beer, pues esta nos dice que la absorbancia de radiación electromagnética producida por una especie absorbente es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la disolución y a la concentración en ésta de la sustancia que produce la absorción (Serrano, J., 2005).

3 Metodología

3.1 Desarrollo del método

3.1.1 Muestra de ortiga

Se utilizó Ortiga en polvo materia prima distribuida por Fitoplants, esta muestra se conservó a temperatura ambiente y evitando la humedad.

3.1.2 Preparación de extracto para la determinación de fenoles totales

Se pesaron 100 mg de Ortiga en polvo completamente seco, y se llevaron a un balón volumétrico de 100 mL con agua purificada, es decir agua desionizada, luego al ultrasonido a 60°C durante 10 minutos, y se dejó reposar durante 20 minutos y finalmente se aforó.

3.1.3 Preparación del carbonato de calcio al 20% p/v

Se preparó la solución de carbonato de calcio pesando 20 g y se llevó a un balón volumétrico de 100 mL con agua purificada hasta las tres cuartas partes de su capacidad, se agitó durante 20 minutos, se aforó y finalmente se agitó por 5 minutos más.

3.1.4 Preparación de la solución madre del estándar de ácido gálico

Se pesaron 10,0 mg de ácido gálico y se llevaron a un balón volumétrico de 100,0 ml, se agregó agua purificada hasta las tres cuartas partes y se agitó durante 10 minutos, luego se dejó la muestra en reposo durante 15 minutos y se aforó, se obtuvo una concentración de 100,0 ppm.

3.1.5 Preparación del reactivo folin

Se llevaron 50 mL de folin 2,0 Molar a un balón volumétrico de 100 mL, se agregó agua purificada hasta las tres cuartas partes de la capacidad de su volumen y se agitó durante 20 minutos, se aforó y se agitó 5 minutos más.

3.2 Validación del método de cuantificación de polifenoles

Todos los parámetros y características del desempeño analítico de la validación se evaluaron para el estándar ácido gálico, debido a que es un ácido fenólico natural y puede ser usado como equivalente; con el fin de obtener datos confiables y precisos.

3.2.1 Preparación de las muestras para las lecturas en el espectrofotómetro

Se tomaron 2,0 mL de cada muestra para cada prueba y se transfirió a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, se agregaron 3,0 ml de reactivo folin y se dejó reaccionar durante 5 minutos finalmente se agregaron 3,0 mL de carbonato de sodio y se llevó a oscuridad durante dos horas a temperatura ambiente.

3.2.2 Preparación del blanco utilizado para las lecturas en el espectrofotómetro

Se tomaron 2,0 mL de agua purificada y se transfirió a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, se agregaron 3,0 ml de reactivo folin y se dejó reaccionar durante 5 minutos finalmente se agregaron 3,0 mL de carbonato de sodio y se llevó a oscuridad durante dos horas.

3.2.3 Selección de longitud de onda

Se realizó un barrido espectral en un rango de 600 nm a 900 nm para determinación de la longitud de onda a la cual se presenta el pico máximo absorción del principio activo.

3.2.4 Selectividad

Se prepararon 10 muestras donde por cada una se tomaron 2,0 mL de agua purificada y se transfirió a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, se agregaron 3,0 ml de reactivo folin y se dejó reaccionar durante 5 minutos finalmente se agregaron 3,0 mL de carbonato de sodio y se llevaron a oscuridad durante dos horas. Se realizó un corrido espectral, y se tomaron las absorbancias de las 10 muestras.

3.2.5 Linealidad

Se prepararon 5 concentraciones de la muestra ácido gálico correspondientes a 1 ppm, 5ppm, 15 ppm, 20 ppm y 30 ppm, a partir de la solución madre de 100,0 ppm. Se evaluó la proporcionalidad de la concentración (ppm) frente a su respuesta en absorbancia (Abs).

Solución de 1,0 ppm: De la solución concentrada a 100,0 ppm, se transfirió 1,0 ml a un balón volumétrico de 100,0 ml, se llenó el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y se sometió a agitación durante 5 minutos, luego se dejó la muestra en reposo durante 15 minutos y se aforó con agua para obtener una concentración de 1,0 ppm.

Solución de 5,0 ppm: De la solución concentrada a 100,0 ppm, se transfirió 10,0 ml a un balón volumétrico de 200,0 ml, se llenó el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y se sometió a agitación durante 5 minutos, luego se dejó la muestra en reposo durante 15 minutos y se aforó con agua para obtener una concentración de 5,0 ppm.

Solución de 15,0 ppm: De la solución concentrada a 100,0 ppm, se transfirió 15,0 ml a un balón volumétrico de 100,0 ml, se llenó el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y se sometió a agitación durante 5 minutos, luego se dejó la muestra en reposo durante 15 minutos y se aforó con agua para obtener una concentración de 15,0 ppm.

Solución de 20,0 ppm: De la solución concentrada a 100,0 ppm, se transfirió 10,0 ml a un balón volumétrico de 50,0 ml, se llenó el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y se sometió a agitación durante 5 minutos, luego se dejó la muestra en reposo durante 15 minutos y se aforó con agua para obtener una concentración de 20,0 ppm.

Solución de 30,0 ppm: De la solución concentrada a 100,0 ppm, se transfirió 15,0 ml a un balón volumétrico de 50,0 ml, se llenó el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y

se sometió a agitación durante 5 minutos, luego se dejó la muestra en reposo durante 15 minutos y se aforó con agua para obtener una concentración de 30,0 ppm.

3.2.6 Precisión

Se realizó repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad: Se realizaron 9 lecturas de la solución de ácido gálico de concentración de 15,0 ppm y luego 9 lecturas de la muestra de ortiga.

Precisión intermedia: Esta prueba la realizaron dos analistas, analista A y analista B, a muestras preparadas por cada uno. Se tomaron lecturas a concentraciones de 5,0 ppm, 15,0 ppm y 20,0 ppm de ácido gálico y se prepararon muestras de ortiga con 75,0 mg, 100,0 mg y 125,0 mg, y de igual manera se tomaron sus respectivas lecturas.

3.2.7 Exactitud

Se realizaron lecturas a tres muestras de ortiga preparadas con 50,0 mg, 100,0 mg y 150,0 mg y a las soluciones de ácido gálico con concentraciones de 1,0 ppm, 15,0 ppm y 30,0 ppm.

Con el fin de tener mayor claridad del procedimiento para la validación del método analítico se realizó un diagrama de flujo (Anexo 1)

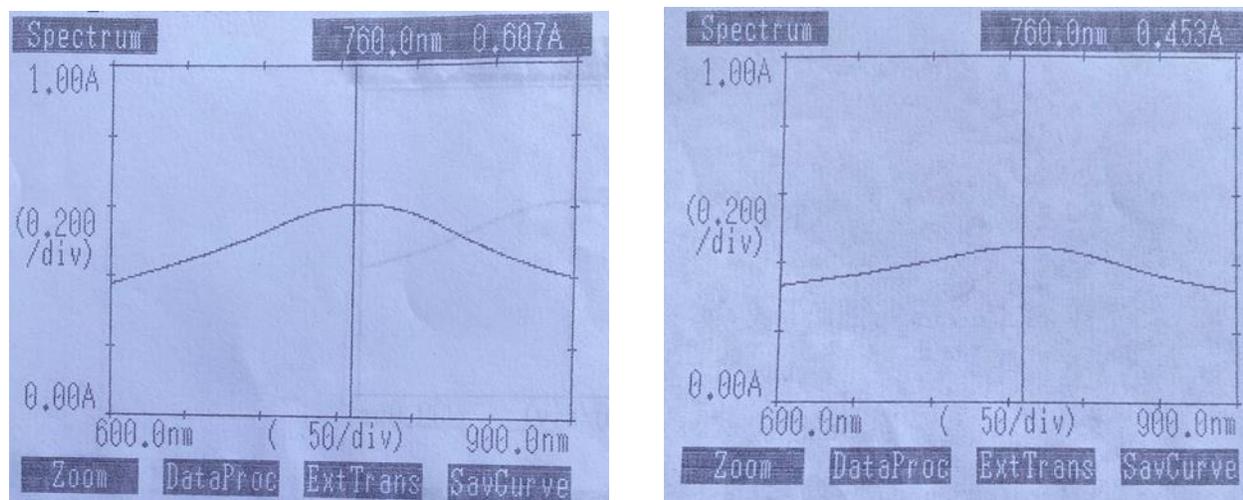
4 Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos teniendo en cuenta los criterios de aceptación presentados en el PROTOCOLO DE VALIDACIÓN TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN LA MATERIA PRIMA ORTIGA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS (Anexo 2).

4.1 Barridos espectrales y selección de longitud de onda.

La figura 5 muestra los barridos espectrales de la muestra de ácido gálico y de la preparación de la muestra de ortiga, entre 600 y 900 nm, de los cuales podemos observar que el pico de absorción máximo se presenta a una longitud de onda de 760 nm, para el ácido gálico se obtiene una absorbancia de 0,607 y para la muestra de ortiga de 0,453.

Figura 5. Barridos espectrales

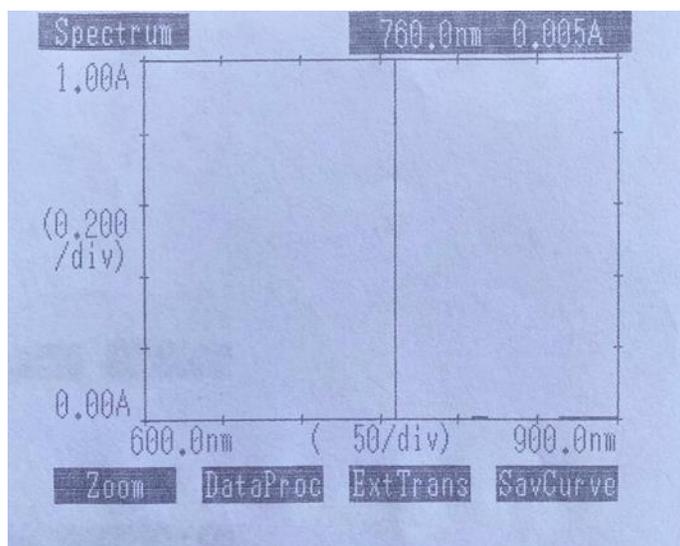


Nota. Barridos espectrales para la determinación de λ máxima de absorción del ácido gálico (izquierda) y de la ortiga (derecha).

4.2 Selectividad

La figura 6 muestra el barrido espectral del blanco en el rango espectral de 600 nm a 900 nm, el cual no presenta máximos de absorción en ese intervalo, como si los mostraron las muestras de ácido gálico y de ortiga.

Figura 6. Barrido espectral del blanco.



La tabla 1 muestra los resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 760 nm al realizar 10 lecturas del blanco, además su promedio y su desviación.

Tabla 1. Datos primarios obtenidos de la prueba de selectividad

Muestra	Blanco
1	0,0009
2	0,0011
3	0,0005
4	0,0005
5	0,0004
6	0,0005
7	0,0010
8	0,0005

9	0,0011
10	0,0002
PROMEDIO	0,0007
SD	0,0003

4.2.1 Cálculos de las relaciones selectivas

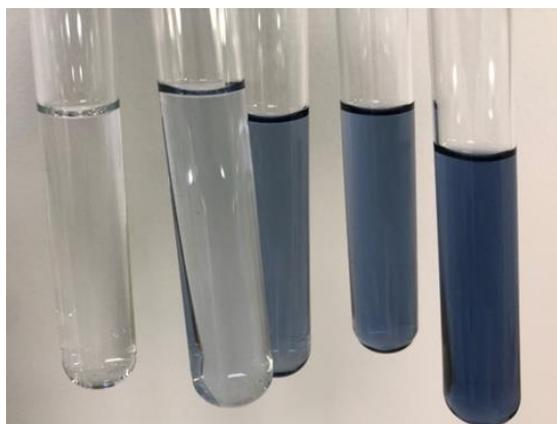
La ecuación 1 expone el cálculo de la relación selectiva del blanco respecto al valor de absorbancia obtenida a 1,0 ppm en la curva de linealidad para el ácido gálico.

$$\text{Relación de selectividad para el blanco} = \frac{0,0176}{0,0007} = 25,142857 \quad (1)$$

El promedio de las absorbancias obtenidas para el blanco se encuentra muy cercanas a cero mostrando que pueden generar muy poca interferencia en la lectura del ácido gálico frente al valor más bajo de la curva de linealidad, Además, la absorbancia obtenida por el blanco es 25,142857 veces menor a la absorbancia obtenida en la lectura de la curva de la linealidad del ácido gálico a una concentración de 1,0 ppm.

4.3 Linealidad

Figura 7. *Intensidad de color*



Nota: Intensidad de color formador en el punto final de la reacción de las muestras de ácido gálico a 1,0; 5,0; 15,0; 20,0 y 30,0 ppm de ácido gálico respectivamente.

A continuación, se reportan los datos obtenidos de absorbancias en la prueba de linealidad para las diferentes concentraciones.

Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos para la prueba de linealidad con el estándar ácido gálico.

Concentración	Absorbancia Ácido Gálico λ 760 nm
1,0 ppm	0,0176
5,0 ppm	0,1460
15,0 ppm	0,4807
20,0 ppm	0,6437
30,0 ppm	0,9745

Variable dependiente: Absorbancia (Abs)

Variable independiente: Concentración de AG (ppm)

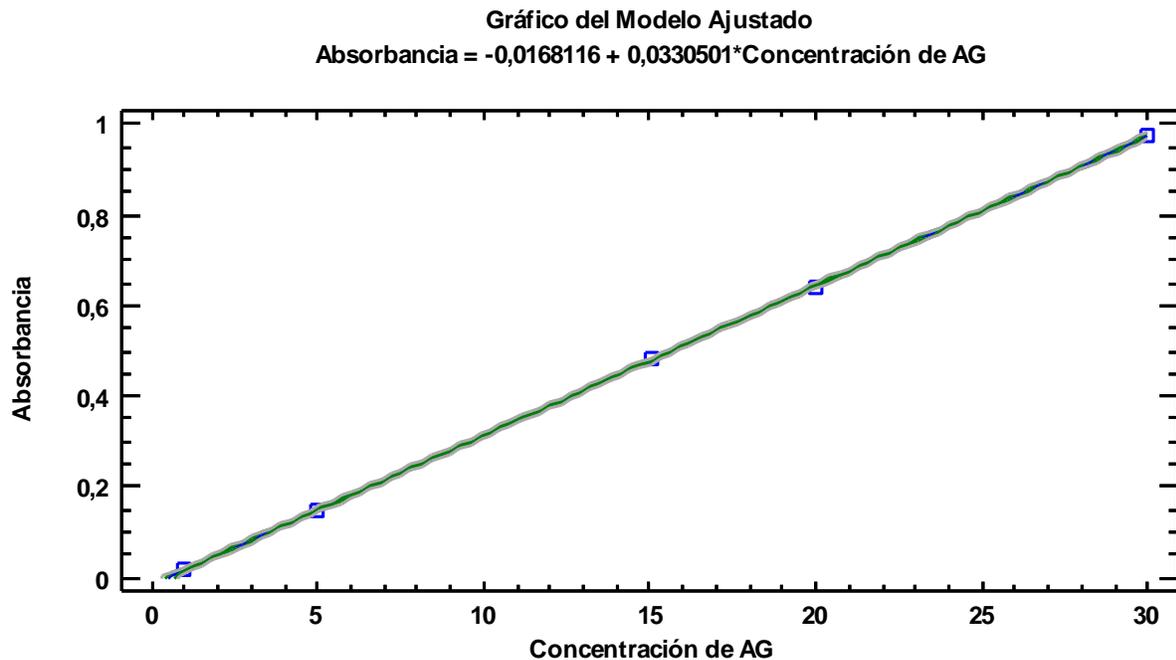
Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Tabla 3. Coeficientes del modelo de regresión lineal.

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0,0168116	0,00145916	-11,5214	0,0014
Pendiente	0,0330501	0,000082848	398,925	0,0000

Tabla 4. Análisis de varianza por ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,592906	1	0,592906	159140,95	0,0000
Residuo	0,000011177	3	0,00000372566		
Total (Corr.)	0,592917	4			

Figura 8. Modelo de regresión lineal para el ácido gálico.

Coefficiente de Correlación = 0,999991

R-cuadrada = 99,9981 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9975 por ciento

Error absoluto medio = 0,00124855

Los datos obtenidos para la prueba se ajustan a un modelo de regresión lineal con un coeficiente de correlación igual a 0,999991 el cual describe una estrecha relación entre la variable respuesta y la concentración de ácido gálico a 760 nm mediante la siguiente ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Absorbancia} = -0,0168116 + 0,0330501 \cdot \text{Concentración de AG}$$

Como el valor P de la tabla 4 para el análisis de varianza es menor a 0,05 existe una relación estadísticamente significativa entre las variables de absorbancia y la concentración a un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,9981% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,999991, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

4.3.1 Datos de la prueba de hipótesis para la pendiente y el intercepto

Hipótesis nula: pendiente = 0

Hipótesis alternativa: Pendiente \neq 0

Tabla 5. Datos calculados para las pruebas de hipótesis.

Sumatorias	Resultados
Σx^2	1551
Σy^2	1,61669819
Σx	71
Σy	2,2625
Σxy	50,0671
a	-0,0168116
b	0,0330501
t student n-2 al 95,0% confianza	2,3534

4.3.1.1 Cálculos para los tests de linealidad y proporcionalidad.

Para llevar a cabo esta prueba se recurrió a la prueba de t de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significancia $\alpha = 0,05$.

Con el fin de obtener los límites de confianza de la pendiente (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito) obtenida en la regresión lineal, es necesario obtener la desviación de está a partir del desarrollo de las siguientes ecuaciones:

Primero se calculó la varianza del error experimental total (S^2_{yx}) de la prueba de linealidad realizada a las diferentes concentraciones de ácido gálico, este cálculo se observa en la ecuación 2 donde:

- Σy^2 es la sumatoria de las absorbancias al cuadrado, obtenidas en la prueba de la linealidad en las diferentes concentraciones de ácido gálico realizadas.
- a: es el intercepto de la ecuación de regresión lineal obtenida en la prueba de linealidad.
- Σy es la sumatoria de las absorbancias obtenidas en la prueba de la linealidad.
- b es s la pendiente de la ecuación de regresión lineal obtenida en la prueba de linealidad.

- $\sum xy$ es la sumatoria del resultado del producto de la concentración con respecto a la respuesta obtenida, es decir, la absorbancia.
- n: número de datos.

$$S^2_{yx} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2} \quad (2)$$

$$S^2_{yx} = \frac{(1,61669819) - (-0,0168116 * 2,2625) - (0,0330501 * 50,0671)}{5 - 2} = 3,92443 \times 10^{-6}$$

Posterior a la obtención del resultado de la varianza del error experimental total, se calculó la varianza de la pendiente (S^2b) utilizando la ecuación 3, donde:

- S^2_{yx} es la varianza del error experimental total obtenida en la ecuación 2.
- $\sum x^2$ es la sumatoria de las concentraciones de ácido gálico utilizadas en la prueba de linealidad al cuadrado.
- $\sum x$ es la sumatoria de las concentraciones de ácido gálico utilizadas en la prueba de linealidad.
- n es el número de datos.

$$S^2b = \frac{3,92443 \times 10^{-6}}{1551 - \frac{(71)^2}{5}} = 7,229974208 \times 10^{-9} \quad (3)$$

Para la obtención de la desviación de la pendiente (Sb), ecuación 4, se calculó la raíz cuadrada de la varianza de la pendiente obtenida anteriormente en la ecuación 3.

$$Sb = \sqrt{S^2b} = \sqrt{7,229974208 \times 10^{-9}} = 8,502925501 \times 10^{-5} \quad (4)$$

$$Sa = \sqrt{S^2a} = \sqrt{2,242737999 \times 10^{-6}} = 1,497577377 \times 10^{-3} \quad (7)$$

Finalmente se calcularon los límites de confianza del término independiente, es decir del intercepto, ecuación 8. Se realizó el producto entre la desviación del intercepto obtenida en la ecuación 7 y el valor t n-2 al 95,0% de confianza, tomado de la tabla de “t de Students (Anexo 3), siendo este producto restado o sumado respectivamente al valor del intercepto obtenido de la regresión lineal de la prueba de linealidad.

$$-0,0168116 - (2,3534 \times 1,497577377 \times 10^{-3}) = -0,0203359986$$

$$a \pm t * Sa \quad (8)$$

$$-0,0168116 + (2,3534 \times 1,497577377 \times 10^{-3}) = 0,0132872014$$

Tabla 6. Intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto al 95,0% de confianza.

Parámetro	Error Estándar	Límites de Confianza	
		Inferior	superior
Pendiente	$8,502925501 \times 10^{-5}$	0,03284999215	0,03325020785
Intercepto	$1,497577377 \times 10^{-3}$	-0,0203359986	0,0132872014

En la tabla 3 se observa que el estadístico T para la pendiente es igual a 398,925 siendo mucho mayor que el t de student de 2,3534 para n-2 grados de libertad, indicando que la probabilidad de b ser de \neq de 0 es muy elevada por ende se acepta la hipótesis alternativa con un 95,0% de confianza. Además, en esta misma tabla se observa que el estadístico T para el intercepto es igual a -11,5214 siendo mucho menor que la T de student de 2,3534 para n-2 grados de libertad, indicando que el intercepto es estadísticamente igual o cercano a cero, por ende, se la acepta la hipótesis nula con un 95,0% de confianza. De estas pruebas también se obtiene que los límites de confianza para el término independiente o el intercepto es desde -0,0203359986 a 0,0132872014

observando que incluyen el cero, por lo que podemos decir que cumple con la condición de proporcionalidad (tabla 6).

4.3.1.1 Coeficientes de variación para los factores de respuesta.

La tabla 7 muestra los valores obtenidos para los factores de respuesta al relacionar la concentración y las absorbancias.

Tabla 7. Datos calculados para los factores de respuesta (ppm/Abs)

Concentración (ppm)	Absorbancia λ 760nm	Factores de respuesta Abs/(ppm)
1,0	0,0176	0,01760
5,0	0,1460	0,02920
15,0	0,4807	0,03205
20,0	0,6437	0,03219
30,0	0,9745	0,03248

Tabla 8. Resumen estadístico para los factores de respuesta

Recuento	5
Promedio	0,028704
Desviación Estándar	0,00634726
Coefficiente de Variación	22,1128%
Mínimo	0,0176
Máximo	0,03248
Rango	0,01488
Sesgo Estandarizado	-1,83747
Curtosis Estandarizada	1,85991

Tabla 9. Prueba de normalidad para factores de respuesta.

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,698804	0,108298

De la tabla 8 se evidencia una desviación estándar de 0,00634726 y el coeficiente de variación de los factores de respuesta es igual a 22,1128% Debido a que el valor-P en la tabla de

normalidad de la prueba de Shapiro-wilk (Tabla 9) es de 0,108298 al ser mayor a 0,05 se puede estimar que los datos obtenidos en los factores de respuesta provienen de una distribución normal.

Se validó la linealidad de la metodología del sistema, para lo cual se partió de una solución concentrada de estándar ácido gálico, preparando una curva de calibrado con cinco niveles de concentración del estándar en el rango de trabajo de 1,0 ppm – 30,0 ppm. Con respecto a la evaluación de los coeficientes de determinación y de correlación en el sistema demostraron correlación entre la concentración de ácido gálico y la absorbancia obtenida.

Se aplicaron diferentes pruebas estadísticas para demostrar la linealidad del sistema, como el test de proporcionalidad del intercepto, donde se demostró la condición de proporcionalidad de esté; y el test de la pendiente, donde se encontró el intervalo de confianza de esté. Finalmente se demostró la distribución normal de los factores de respuesta calculados en la tabla 7.

4.4 Precisión

4.4.1 Repetibilidad

Tabla 10. Datos obtenidos para la prueba de repetibilidad.

Muestra	Abs Ácido Gálico (15,0 ppm) $\lambda 760$ nm	Abs Muestra de ortiga (100mg) $\lambda 760$ nm
1	0,4812	0,4032
2	0,4814	0,4005
3	0,4828	0,4044
4	0,4817	0,4014
5	0,4816	0,3993
6	0,4808	0,4020
7	0,4812	0,4039
8	0,4816	0,4022
9	0,4812	0,3995

Tabla 11. Resumen estadístico para el ácido gálico (15,0 ppm) y para la ortiga (100 mg) respectivamente.

Muestra	Ácido Gálico	Ortiga
Recuento	9	9
Promedio	0,4815	0,401822
Desviación Estándar	0,000561249	0,00182741
Coefficiente de Variación	0,116563%	0,454782%
Mínimo	0,4808	0,3993
Máximo	0,4828	0,4044
Rango	0,0020	0,0051
Sesgo Estandarizado	1,984	-0,0703512
Curtosis Estandarizada	2,36221	-0,75408

4.4.1.1 Intervalos de confianza para absorbancia

Ácido gálico:

Intervalos de confianza del 95,0% para la media: 0,4815 +/- 0,000431415 [0,481069; 0,481931]

Intervalos de confianza del 95,0% para la desviación estándar: [0,000379099; 0,00107522]

Ortiga:

Intervalos de confianza del 95,0% para la media: 0,4018 +/- 0,00140468 [0,400418; 0,403227]

Intervalos de confianza del 95,0% para la desviación estándar: [0,00123434; 0,0035009]

Se observa en la tabla 11 para el ácido gálico que el coeficiente de variación es igual a 0,11%, la desviación estándar es de 0,00056, indicando que existe cercanía entre los datos, de igual manera para la ortiga tenemos un coeficiente de variación de 0,45% y una desviación estándar de 0,0018.

4.4.2 Precisión intermedia:

4.4.2.1 Precisión intermedia para el ácido gálico:

Tabla 12. Datos obtenidos en el ensayo de precisión intermedia para el ácido gálico.

Analistas	Concentración	Resultados Abs
	Ppm	λ nm
ANALISTA A	5,0	0,1478
ANALISTA A	15,0	0,4812
ANALISTA A	20,0	0,6451
ANALISTA A	5,0	0,1485
ANALISTA A	15,0	0,4827
ANALISTA A	20,0	0,6462
ANALISTA B	5,0	0,1467
ANALISTA B	15,0	0,4800
ANALISTA B	20,0	0,6449
ANALISTA B	5,0	0,1483
ANALISTA B	15,0	0,4873
ANALISTA B	20,0	0,6467

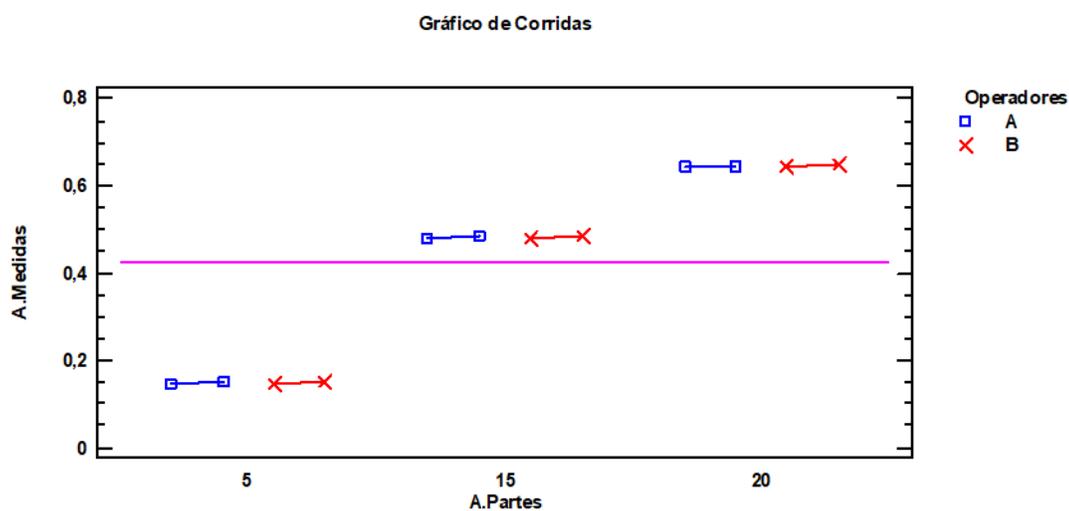
Tabla 13. Resumen estudio R&R por el método de varianza para el ácido gálico.

Medición	Sigma	Porcentaje	Varianza	Porcentaje de	Porcentaje
Unidad	Estimada	Variación Total	Estimada	Contribución	de R&R
Repetibilidad	0,00197849	0,759563	0,00000391441	0,00576937	100,00
Reporducibilidad	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
R & R	0,00197849	0,759563	0,00000391441	0,00576937	100,00
Partes	0,260469	99,9971	0,0678442	99,9942	
Variación Total	0,260477	100.0	0,0678481		

Tabla 14. ANOVA análisis de varianza estudio R&R para el ácido gálico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Operadores	4,8E-7	1	4,8E-7	0,11	0,7468
Partes	0,515543	2	0,257771	59990,45	0,0000
Residual	0,000034375	8	0,00000429687		
Total	0,515578	11			

Figura 9. Secuencias o comportamiento de los analistas para los tres niveles de concentración de ácido gálico.



No existen diferencias estadísticamente significativas entre analistas A y B con relación a los estimados entre las muestras evaluadas en el estudio R&R por el método varianza. El porcentaje de variación total es de 0,26%, siendo este mucho menor que 5,0%.

En el análisis de varianza al 95,0% de confianza de la tabla 14 se observa que el valor-p para los operadores es de 0,7468 siendo mayor de 0,05 lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de Absorbancias obtenidos por las analistas A y B. Lo antes dicho se puede verificar en la figura 9, donde se puede observar la similitud de los datos entre los analistas A y B.

4.4.2.2 Precisión intermedia para las muestras de ortiga.

Tabla 15. Datos obtenidos en el ensayo de precisión intermedia para la ortiga.

Analistas	Ortiga (mg)	Resultados Abs λ 760nm
ANALISTA A	75	0,1478
ANALISTA A	100	0,4812
ANALISTA A	125	0,6451
ANALISTA A	75	0,1485
ANALISTA A	100	0,4827

ANALISTA A	125	0,6462
ANALISTA B	75	0,1467
ANALISTA B	100	0,4800
ANALISTA B	125	0,6449
ANALISTA B	75	0,1483
ANALISTA B	100	0,4873
ANALISTA B	125	0,6467

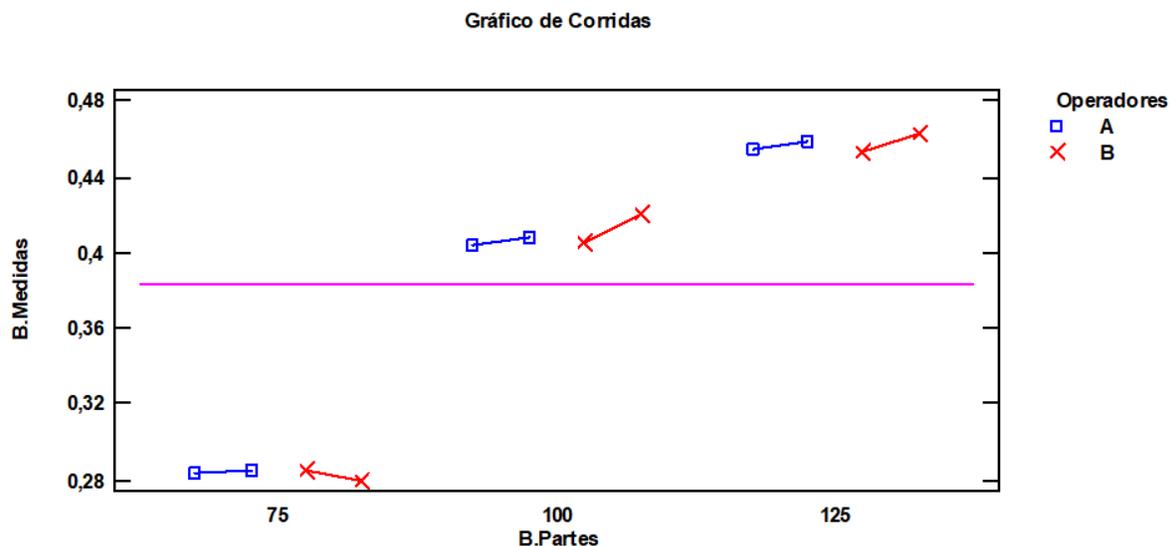
Tabla 16. Resumen estudio R&R por el método de varianza para las muestras de ortiga.

Medición	Sigma	Porcentaje	Varianza	Porcentaje de	Porcentaje
Unidad	Estimada	Variación Total	Estimada	Contribución	de R&R
Repetibilidad	0,00535605	5,87563	0,0000286872	0,34523	100,00
Reproducibilidad	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
R & R	0,00535605	5,87563	0,0000286872	0,34523	100,00
Partes	0,0909995	99,8272	0,0082809	99,6548	
Variación Total	0,0911569	100,0	0,00830959		

Tabla 17. ANOVA análisis de varianza estudio R&R para las muestras de ortiga.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadra do Medio	Razón-F	Valor-P
Operadores	0,0000175208	1	0,0000175208	0,65	0,4436
Partes	0,0645992	2	0,0322996	1197,16	0,0000
Residual	0,000215842	8	0,0000269802		

Figura 10. Secuencias o comportamiento de los analistas para los tres diferentes pesos de las muestras de ortiga.



No existen diferencias estadísticamente significativas entre analistas A y B con relación a los estimados entre las muestras evaluadas en el estudio R&R por el método varianza. El porcentaje de variación total es de 0,0911569%, observado en la tabla 16, siendo este mucho menor que 5,0%.

En el análisis de varianza al 95,0% de confianza de la tabla 17 se observa que el valor-p para los operadores es de 0,4436 siendo mayor de 0,05 lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de Absorbancias obtenidos por las analistas A y B. Lo antes dicho se puede verificar en la figura 10, donde se puede observar la similitud de los datos entre los analistas A y B.

4.5 Exactitud

4.5.1 Exactitud ácido gálico:

Utilizando la ecuación de la recta obtenida en la prueba de la linealidad obtenemos la concentración real y el porcentaje de recuperación obtenido teniendo en cuenta la concentración teórica, estos datos se observan en la tabla 18, se observa además que la concentración hallada y la concentración teórica tienen datos muy cercanos o similares, y un porcentaje de recuperación superior al 99,00%, concluyendo que el método posee la exactitud necesaria para la validación.

Tabla 18. Datos obtenidos en la exactitud para el ácido gálico.

Concentración teórica ppm	Abs Ácido Gálico		% De recuperación
	λ 760nm	Ppm obtenidas	
1	0,0179	1,050	105,027
1	0,0174	1,035	103,514
1	0,0182	1,059	105,935
15	0,4807	15,053	100,355
15	0,4797	15,023	100,153
15	0,4755	14,896	99,306
30	0,9724	29,931	99,769
30	0,975	30,009	100,031
30	0,9745	29,994	99,981

Tabla 19. Resumen estadístico de la prueba de exactitud del ácido gálico.

<i>Concentración</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>de</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
1	3	0,0178333	0,000404145	2,26623%		0,0174	0,0182
15	3	0,478633	0,00275923	0,57648%		0,4755	0,4807
30	3	0,973967	0,00137961	0,141649%		0,9724	0,975
Total	9	0,490144	0,414111	84,4875%		0,0174	0,975

Tabla 20. ANOVA para absorbancia por concentración del ácido gálico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1,37188	2	0,685941	212585,13	0,0000
Intra grupos	0,00001936	6	0,00000322667		
Total (Corr.)	1,3719	8			

Tabla 21. Verificación de la varianza test de C de Cochran en la prueba de exactitud del ácido gálico.

<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
C de Cochran	0,786501 0,136745

Los valores obtenidos en las desviaciones estándar observados en la tabla 18 en la prueba de exactitud del ácido gálico son muy cercanos a cero, y todos los coeficientes de variación son menores al 5,0%, por lo que se concluye que el método es exacto.

La razón-F, evidenciada en la tabla 20 que en este caso es igual a 212585,13, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de ABSORBANCIA entre un nivel de CONCENTRACIÓN y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

El estadístico mostrado en la tabla 21 evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de ABSORBANCIA dentro de cada uno de los 3 niveles de CONCENTRACIÓN es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

4.5.2 Exactitud ortiga:

De manera similar a la prueba de exactitud del ácido gálico se utiliza la ecuación obtenida en la prueba de la linealidad para calcular las partes por millón obtenidas cuantificadas como polifenoles totales de la muestra de ortiga de acuerdo con los miligramos utilizados.

Tabla 22. Datos obtenidos para la exactitud de la muestra de ortiga.

Ortiga (mg)	Abs Ortiga	
	λ 760nm	Ppm obtenidas
50	0,1963	6,44813783
50	0,191	6,28777523
50	0,1993	6,53890911
100	0,4058	12,7869991
100	0,4078	12,8475133
100	0,4204	13,2287527
150	0,4784	14,9836642
150	0,4902	15,3406979
150	0,477	14,9413043

Tabla 23. Resumen estadístico para la prueba de exactitud de la muestra de ortiga.

Ortiga	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
50	3	0,195533	0,00420278	2,14939%	0,191	0,1993	0,0083
100	3	0,411333	0,00791539	1,92432%	0,4058	0,4204	0,0146
150	3	0,481867	0,00725075	1,50472%	0,477	0,4902	0,0132
Total	9	0,362911	0,129324	35,6351%	0,191	0,4902	0,2992

Tabla 24. ANOVA para absorbancia por mg de ortiga.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,133531	2	0,0667657	1507,24	0,0000
Intra grupos	0,00026578	6	0,0000442967		
Total (Corr.)	0,133797	8			

Tabla 25. Verificación de la varianza test de C de Cochran en la prueba de exactitud de la muestra de ortiga.

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
C de Cochran	0,471468	0,838038

Los valores obtenidos en las desviaciones estándar observados en la tabla 23 en la prueba de exactitud de la ortiga son muy cercanos a cero, y todos los coeficientes de variación son menores al 5,0%, por lo que se concluye que el método es exacto.

La razón-F, evidenciada en la tabla 23 que en este caso es igual a 1507,24, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de ABSORBANCIA entre un nivel de CONCENTRACIÓN y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

El estadístico mostrado en la tabla 24 evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de ABSORBANCIA dentro de cada uno de los 3 niveles de CONCENTRACIÓN es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

De la tabla 22 podemos observar que para la ortiga utilizada en esta validación para 50 mg se obtienen aproximadamente 6 ppm de polifenoles, en 100 mg se obtienen aproximadamente 12,5 ppm y en 150 mg se obtienen aproximadamente 15 ppm de polifenoles.

5 Conclusiones

El método utilizado para la extracción de polifenoles utilizando el ultrasonido es adecuado debido a que la muestra reacciona correctamente con el reactivo folin.

El método espectrofotométrico para la determinación de polifenoles presentes en la materia prima ortiga es selectivo debido a que el blanco no presentó absorbancias significativas a una longitud de onda de 760 nm. Además, cumple con la condición de la linealidad debido a que se obtiene un coeficiente de correlación de 0,999991, cumple con la prueba de hipótesis para la pendiente demostrando que esta tiene un valor diferente de cero (0).

Se cumple con la prueba de repetibilidad al obtener un coeficiente de variación entre las 9 lecturas consecutivas a 15,0ppm de ácido gálico igual a 0,116563% y para la muestra de la ortiga de 100 mg es de 0,7093%, indicando que existe cercanía entre los datos y encontrándose por debajo del 5,0%.

6 Recomendaciones

Se recomienda estudiar los polifenoles presentes en otras materias primas como caléndula, alcachofa, entre otras; y en productos terminados. Además, realizar investigaciones sobre las propiedades de la ortiga y aplicarlas a nuevos productos.

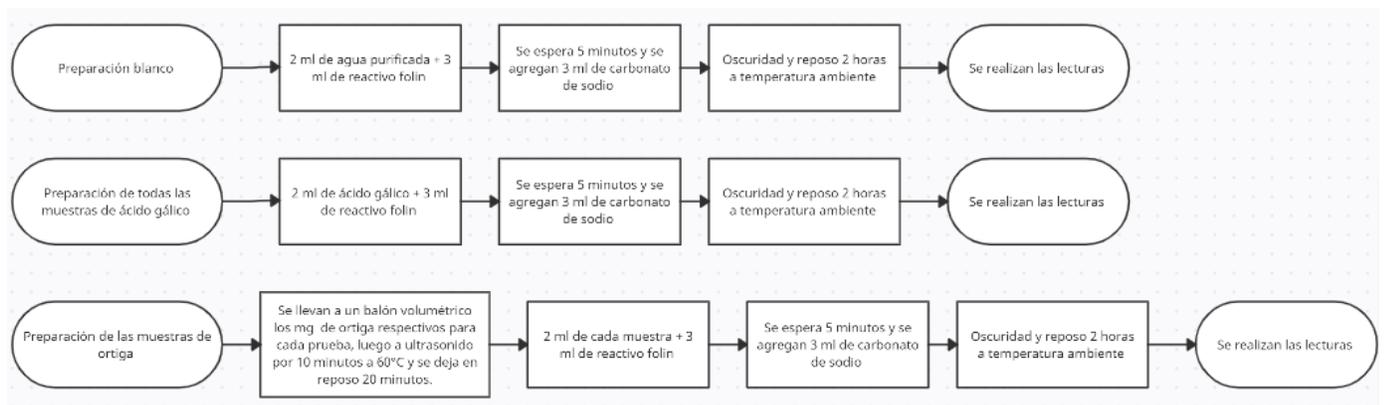
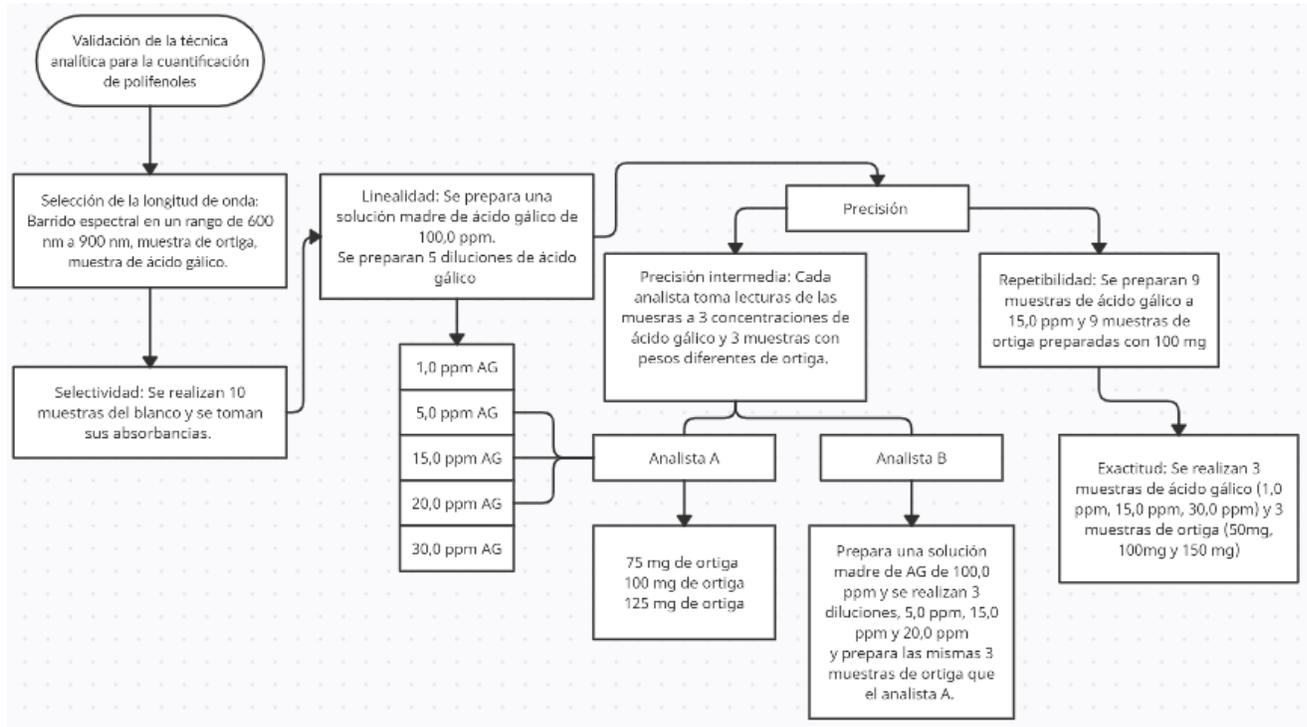
Referencias

- Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria (AEFI). (2001). Validación de métodos análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. En Validación de métodos analíticos (págs. 17-86). España: AEFI.
- Bravo, K., & Pereañez, J. A. (2016). Colombian biodiversity, an opportunity for the strengthening of the pharmaceutical and cosmetic industries. *Vitae*, 23(3), 163-165.
- Ciriza, J. H. (2007). ORTIGA MAYOR URTICA DIOICA L. Medicina naturista, 1(2).
- Colombia. Ministerio de salud y protección social. (2016). Resolución 1160 de 2016: Por la cual se establecen los Manuales de Buenas Prácticas de Manufactura y las Guías de Inspección de Laboratorios o Establecimientos de Producción de medicamentos, para la obtención del Certificado de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura
- Díaz, N. et al. (2006). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- Fortes, C. S., Silva, C., & Camargo, E. E. S. (2015). Pharmaceutical indication of medicinal plants and phytotherapy. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 5(4).
- Giraldo Quintero, S. E., Bernal Lizarazú, M. C., Morales Robayo, A., Pardo Lobo, A. Z., & Gamba Molano, L. (2015). Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá, DC. NOVA: *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 13(23).
- Gutiérrez, D., Ortiz, C. & Mendoza, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante. En: Memorias del Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro. En: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf.
- Gyllenhaal, C., Quinn, M. L., & Soejarto, D. D. (1986). Research on Colombian medicinal plants: roles and resources for plant taxonomists. *Caldasia*, 199-217.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 1-13.

- Joshi, B. C., Mukhija, M., & Kalia, A. N. (2014). Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 8(4).
- Meza, J & Gutiérrez, M. (2006). Validación del proceso de manufactura y envase para el producto Calmadex solución inyectable en Vecol SA. Tesis de Licenciatura, Universidad de la Sabana.
- Navarro, M. P., Hernández, Y. R., & Pérez, Y. S. (2014). Validación del método por espectrofotometría ultravioleta para control de calidad de clorhidrato de ciprofloxacina en tabletas Ciprecu. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(2), 199-212.
- Quisi Aragadovay, R. A. (2012). Estudio Comparativo de la Actividad Hipoglucemiante del Extracto de Ortiga (*Urtica dioica*), Extracto de Berro (*Nasturtium officinale*) y Extracto de Nogal (*Juglans regia*) en Ratas (*Rattus norvegicus*) con Hiperglucemia Inducida. Riobamba, 134. Trabajo de grado (Profesional en bioquímica farmacéutica). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo). Facultad de ciencias.
- Serrano, J. (2005). El espectro electromagnético. Absorción visible-Ultravioleta. Curso: Instrumentación y métodos de análisis químicos. Posgrado en ingeniería del agua y del terreno. En: https://www.upct.es/~minaees/espectro_electromagnetico.pdf
- Tarallo, S. C. (2021). Validation in a Small Pharmaceutical Company. *Handbook of Validation in Pharmaceutical Processes*, 1007–1013. <https://doi.org/10.1201/9781003163138-65>
- Valencia Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (16), 15-29.

Anexos

Anexo 1. Diagrama de flujo del proceso de validación y preparación de las muestras



Anexo 2. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN LA MATERIA PRIMA ORTIGA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.

1. OBJETIVOS

Garantizar la aptitud y validez de la técnica analítica utilizada para la cuantificación de polifenoles en la materia prima ortiga en polvo por espectrofotometría UV-VIS.

2. ALCANCE

Este método aplica para la cuantificación de polifenoles de la materia prima ortiga en polvo.

3. RESPONSABLES.

Es responsabilidad del analista de validación de técnicas la elaboración del protocolo, el informe de validación y ejecución de los parámetros aquí establecidos, con el acompañamiento del jefe de control calidad.

Es responsabilidad de jefatura de validaciones revisar cada uno de los parámetros descritos en el protocolo y el informe de validación para garantizar que los resultados obtenidos sean acordes con los criterios de aceptación.

Es responsabilidad de dirección técnica aprobar y verificar cada uno de los parámetros descritos en el protocolo y el informe de validación para garantizar que los resultados obtenidos sean acordes con los criterios de aceptación.

4. DEFINICIONES.

- **VALIDACIÓN:** Obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.
- **PROTOCOLO DE VALIDACIÓN:** Es un plan experimental diseñado para que cuando se ejecute sea una prueba evidenciada de que un sistema ha sido validado.
- **SELECTIVIDAD:** Capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de una matriz, las impurezas o productos de degradación.
- **LINEALIDAD:** Es la capacidad de obtener resultados de prueba que sean proporcionales entre la concentración del analito y la respuesta.
- **PRECISIÓN:** Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica un procedimiento repetidamente sobre una muestra homogénea.
- **REPETIBILIDAD:** Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista y en un mismo día.

- **PRECISIÓN INTERMEDIA (REPRODUCIBILIDAD):** Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra, pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, días y aparatos).
- **EXACTITUD:** Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero.
- **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:** Condición estadística que debe cumplirse para aprobar o rechazar una prueba analítica.

5. MATERIALES Y EQUIPOS.

5.1. EQUIPOS:

NOMBRE
Espectrofotómetro UV-VIS
Cabina de extracción
Balanza analítica

5.2. MATERIALES:

NOMBRE
Ortiga en polvo
Ácido gálico
Reactivo folin ficalteu
Carbonato de sodio
Agua Purificada

6. METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

Principio del método: Espectrofotometría UV-VIS

Descripción: Se realiza un corrido espectral por triplicado en un rango de 600 nm a 900 nm para determinación de la longitud de onda a la cual se presenta el pico máximo absorción del principio activo.

Preparación del estándar: Pesar 10,0 mg de ácido gálico y llevarlos un balón volumétrico de 100,0 ml para obtener una concentración de 100,0 ppm, agregar agua purificada hasta las tres cuartas partes y agitar durante 10 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua.

Condiciones instrumentales:

- **Modo:** Visible
- **Rango espectral:** 600 nm a 900 nm
- **Celda:** Vidrio de 1 cm de paso
- **Blanco:** Agua purificada.

Selección de longitud de onda: Una vez realizado el barrido espectral se identifica la longitud de onda a la cual se obtiene el pico máximo de absorción y se procede a realizar los análisis correspondientes a selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud.

Lectura de muestra en el espectrofotómetro

- a. Encender el equipo media hora antes de las lecturas.
- b. Seleccionar el modo espectro y fijar el rango de onda de 600 nm a 900 nm
- c. Purgar las celdas de vidrio con el blanco y realizar su respectiva lectura.
- d. Retirar la celda de vidrio ubicada en la posición 1 y purgar 3 veces con la solución muestra aproximadamente durante 1 minuto.
- e. Realizar los corridos espectrales 3 veces.

6.1. SELECTIVIDAD.

Condición analítica: La prueba la ejecuta un mismo analista, en un mismo día.

Realizar 10 veces las lecturas del blanco a la longitud de onda de máxima absorción obtenido del barrido espectral en el rango de 600 nm a 900 nm.

Preparación de la muestra para lectura en vis

Medir 2,0 ml de agua purificada y transferirlo a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, agregar 3,0 ml de reactivo folin y dejar reaccionar durante 5 minutos para posteriormente agregar 3,0 ml de carbonato de sodio y llevar a oscuridad y reposo durante dos horas.

Lectura de muestra en el espectrofotómetro

- a. Encender el equipo media hora antes de las lecturas.
- b. Seleccionar la longitud de onda de máxima obtenido de los barridos espectrales.
- c. Realizar el corrido espectral del placebo en un rango de 600 nm a 900 nm.
- d. Realizar las lecturas de las absorbancias 10 veces para el blanco.
- e. Cálculo de la relación selectiva:

$$\text{Relación selectiva} = \frac{\text{menor Abs obtenida a 1,0ppm}}{\text{promedio de lecturas del blanco}}$$

Ecuación 1. Relación selectiva del blanco

6.1.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN SELECTIVIDA

El corrido espectral del blanco no debe presentar un máximo de absorbancia igual al de la muestra preparada con estándar.

6.2. LINEALIDAD

Condición analítica: Esta prueba la realiza un mismo analista, bajo las mismas condiciones y en un mismo día.

Para la determinación de la linealidad se preparan 5 concentraciones de la muestra ácido gálico correspondientes a 1 ppm, 5 ppm, 15 ppm, 20 ppm y 30 ppm, a partir de una solución madre de 100,0 ppm. Evaluar la proporcionalidad de la concentración (ppm) frente a su respuesta en absorbancia (Abs).

6.2.1. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN, DETERMINACIÓN Y PRUEBA DE HIPÓTESIS

6.2.1.1. Solución madre:

Preparar una solución concentrada a 100,0 ppm de ácido gálico como se describe a continuación: Pesar exactamente 10,0 mg de ácido gálico y transferirlos a un balón volumétrico de 100,0 ml, llenar el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 10 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua.

$$\frac{10,0\text{mg}}{100,0\text{ ml}} \times \frac{1000\text{ml}}{1\text{L}} = 100,0\text{ ppm}$$

Ecuación 2. Solución concentrada de ácido gálico.

Preparar a partir de la solución concentrada de 100,0 ppm diluciones de 1,0 ppm, 5,0 ppm, 15,0 ppm, 20,0 ppm y 30,0 ppm, como se describe a continuación:

6.2.1.2. Solución de 1,0 ppm

De la solución concentrada a 100,0 ppm, transferir 1,0 ml a un balón volumétrico de 100,0 ml, llenar el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 5 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua para obtener una concentración de 1,0 ppm.

6.2.1.3. Solución de 5,0 ppm

De la solución concentrada a 100,0 ppm, transferir 10,0 ml a un balón volumétrico de 200,0 ml, llenar el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 5 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua para obtener una concentración de 5,0 ppm

6.2.1.4. Solución de 15,0 ppm

De la solución concentrada a 100,0 ppm, transferir 15,0 ml a un balón volumétrico de 100,0 ml, llenar el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 5 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua para obtener una concentración de 15,0 ppm

6.2.1.5. Solución de 20,0 ppm

De la solución concentrada a 100,0 ppm, transferir 10,0 ml a un balón volumétrico de 50,0 ml, llenar el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 5

minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua para obtener una concentración de 20,0 ppm.

6.2.1.6. Solución de 30,0 ppm

De la solución concentrada a 100,0 ppm, transferir 15,0 ml a un balón volumétrico de 50,0 ml, llenar el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 5 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua para obtener una concentración de 30,0 ppm.

De cada solución muestra se toman 2 ml y se transfieren a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, agregar 3,0 ml de reactivo folin y dejar reaccionar durante 5 minutos para posteriormente agregar 3,0 ml de carbonato de sodio y llevar a oscuridad y reposo durante dos horas.

6.2.2. COEFICIENTE DE VARIACIÓN PARA LOS FACTORES DE RESPUESTA

Dividir las concentraciones entre la respuesta obtenida en absorbancia para determinar la proporcionalidad en cada nivel a la misma longitud de onda.

6.2.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN LINEALIDAD

- Coeficiente de correlación r : debe ser $\geq 0,990$
- Coeficiente de determinación ajustado con g.l debe ser $\geq 98,0\%$
- Pendiente (b): $b \neq 0$
- Intercepto (a): Valor ideal $a = 0$
- Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f): debe ser $\leq 5,0\%$

6.3. PRECISIÓN

6.3.1. REPETIBILIDAD

Condición analítica: Esta prueba la realiza un mismo analista, bajo las mismas condiciones y en un mismo día.

- Se prepara una solución de ácido gálico a 15,0 ppm y se realizan 9 lecturas consecutivas, además se verifica la respuesta de la absorbancia a la longitud de onda máxima determinada.
- Se prepara 9 veces la muestra de ortiga en polvo para sus respectivas lecturas a la longitud de onda máxima determinada.

Preparación de la muestra ácido gálico para lectura en vis

Pesar 10,0 mg de ácido gálico y llevarlos un balón volumétrico de 100,0 ml para obtener una concentración de 100,0 ppm, agregar agua purificada hasta las tres cuartas partes y agitar durante 10 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua. De esta solución concentrada, transferir 15,0 ml a un balón volumétrico de 100,0 ml, llenar el balón con agua purificada hasta las tres cuartas partes y someter a agitación durante 5 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua para obtener una concentración de **15,0 ppm**.

Preparación de la muestra ortiga en polvo

Pesar 100,0 mg de la materia prima ortiga en polvo y llevarlos a un balón volumétrico de 100,0 ml, agregar agua purificada hasta las tres cuartas partes y llevar a ultrasonido durante 20 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua.

De la solución de ácido gálico se toman 2,0 ml y se transfieren a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, agregar 3,0 ml de reactivo folin y dejar reaccionar durante 5 minutos para posteriormente agregar 3,0 ml de carbonato de sodio y llevar a oscuridad y reposo durante dos horas. Se realiza el mismo procedimiento con la muestra de ortiga en polvo.

Lectura de muestra en el espectrofotómetro

- a. Encender el equipo media hora antes de las lecturas
- b. Programar la longitud de onda obtenida para la muestra de ácido gálico.
- c. Purgar las celdas de vidrio con el blanco y realizar su lectura
- d. Retirar la celda de vidrio ubicada en la posición 1, purgarla con la solución muestra 3 veces.
- e. Realizar 9 lecturas de las absorbancias primeramente la de la solución de ácido gálico, seguida de la solución preparada con ortiga.

6.3.2. PRECISIÓN INTERMEDIA

Condición analítica: Esta prueba la realizan 2 analistas, a diferentes muestras, en diferentes días.

- Las lecturas serán realizadas a la longitud de onda encontrada en el corrido espectral.
- Las lecturas para el ácido gálico del analista A serán realizadas de las muestras de la linealidad para las concentraciones descritas.
- Las lecturas para las muestras de la ortiga del analista A serán realizadas de las muestras preparadas de la repetibilidad.
- El analista B preparará diluciones de 5,0 ppm, 15,0 ppm y 20,0 ppm a partir de una solución concentrada a 100,0 ppm.
- El analista B prepara la muestra de ortiga para sus respectivas lecturas a la longitud de onda máxima determinada.

Preparación de la muestra de ortiga

Pesar 75,0 mg, 100,0 mg y 125,0 mg de la ortiga en polvo y llevar a balones volumétricos, agregar agua purificada hasta las tres cuartas partes y llevar a ultrasonido durante 20 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua. Transferir 2,0 ml de cada muestra a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, agregar 3,0 ml de reactivo folin y dejar reaccionar durante 5 minutos para posteriormente agregar 3,0 ml de carbonato de sodio y llevar a oscuridad y reposo durante dos horas.

6.3.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PRECISIÓN

6.3.3.1. Repetibilidad

- El coeficiente de variación para el nivel aceptable de la muestra de ortiga debe ser $\leq 5\%$.
- El coeficiente de variación para el nivel aceptable de la solución de ácido gálico a 15,0 ppm debe ser $\leq 5\%$.

6.3.3.2. Precisión intermedia

- No existen diferencias estadísticamente significativas entre analistas A y B con relación a los estimados entre las muestras evaluadas en el estudio R&R por el método varianza.
- El porcentaje de variación total entre analistas debe ser $\leq 5\%$
- Tablas ANOVA con $P > 0,05$ no significativo, $P < 0,05$ significativo.

6.4. EXACTITUD

Condición analítica: Esta prueba la realiza un mismo analista, bajo las mismas condiciones y en un mismo día.

Se preparan tres muestras de ortiga pesando 50,0 mg, 100,0 mg y 150,0 mg de la ortiga en polvo y llevar a balones volumétricos, agregar agua purificada hasta las tres cuartas partes y llevar a ultrasonido durante 20 minutos, luego dejar la muestra en reposo durante 15 minutos y aforar con agua. Transferir 2,0 ml de cada muestra a un tubo de ensayo tapa rosca debidamente cubierto de la luz, agregar 3,0 ml de reactivo folin y dejar reaccionar durante 5 minutos para posteriormente agregar 3,0 ml de carbonato de sodio y llevar a oscuridad y reposo durante dos horas.

6.4.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN EXACTITUD

- La concentración no debe tener influencia sobre la variabilidad de los resultados.
- Es exacto, si, el promedio de los resultados de las absorbancias por cada concentración no difiere en más del 2% del valor real hallado con la ecuación de la regresión lineal.

Anexo 3. Tabla "t" de student

ν \ α	.40	.25	.10	.05	.025	.01	.005	.0025	.001	.0005
1	.325	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	318.31	636.62
2	.289	.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	23.326	31.598
3	.277	.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.213	12.924
4	.271	.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	.267	.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	.265	.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	.263	.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	.262	.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	.261	.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	.260	.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	.260	.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	.259	.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	.259	.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	.258	.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	.258	.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	.258	.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	.257	.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	.257	.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	.257	.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	.257	.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	.257	.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	.256	.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	.256	.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	.256	.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	.256	.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	.256	.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	.256	.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	.256	.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	.256	.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	.256	.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	.255	.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	.254	.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	.254	.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
∞	.253	.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

ν = grados de libertad.

Fuente: Montgomery, Douglas. (2002). Probabilidad y estadística aplicada a la ingeniería.