



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

MODALIDAD CLÁSICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de ascaridol en el extracto hexánico de *Chenopodium ambrosioides* (paico) mediante cromatografía de gases – FID.

Trabajo de fin de titulación

AUTORA: Burneo Vivar María Loreto

DIRECTOR: Ojeda Riascos Edgar Santiago, BQF

LOJA - ECUADOR

2012

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, María Loreto Burneo Vivar, declaro conocer y aceptar la disposición del Artículo 67 del Estatuto Orgánico de La Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte de Patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Loja, Mayo del 2012

f).....

María Loreto Burneo

CERTIFICACIÓN

BQF.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DIRECTOR DE TESIS DE GRADO

CERTIFICO:

Haber dirigido la investigación y la elaboración de la tesis: “DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ASCARIDOL EN EL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Chenopodium ambrosioides* (PAICO) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES – FID” la misma que ha sido revisada durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

Loja, Mayo del 2011

f).....

BQF. Edgar Santiago Ojeda Riascos

DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

La presentación, procedimientos y conceptos, así como, los resultados y conclusiones vertidos en el presente trabajo de tesis son de responsabilidad absoluta de la autora.

f).....

María Loreto Burneo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en cuyas aulas tuve la oportunidad de formarme ética e intelectualmente. A mis maestros de Escuela por brindarme su amistad y conocimientos, lo que ha contribuido para mi formación profesional.

A CENTROCESAL por brindarme la oportunidad de realizar una parte de mi proyecto en su laboratorio, así como también por brindarme la asesoría necesaria para culminar con éxitos mis estudios, en especial al Dr. Germánico Silva por su apoyo incondicional.

A mi director de tesis BQF. Santiago Ojeda por su paciencia y dedicación, por ser un buen guía, lo que contribuyo para la finalización del presente proyecto.

DEDICATORIA

A mi abuelito Medardo, el ser más noble que conocí, quien fue mi guía y mi motivación siempre.

A mis padres, hermanos y tíos por su apoyo incondicional día a día.

A mi mejor amigo y compañero, Leo, por ser mi motivo de alegría, mi apoyo incondicional y mi fuente de admiración.

CONTENIDO

	Pág.
.....	
CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
AUTORÍA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO.....	vii
ARTÍCULO.....	xi
RESUMEN.....	xviii
I. PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.....	1
1.1. FIN DEL PROYECTO	1
1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO	1
1.3. COMPONENTES DEL PROYECTO	1
II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	2
2.1 ANTECEDENTES.....	2
2.2 INTRODUCCIÓN.....	2
2.2.1 <i>Chenopodium ambrosioides</i>	2
2.2.1.1 NOMBRES COMUNES.....	3
2.2.1.2 HABITAT Y CULTIVO.....	3
2.2.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y MORFOLOGÍA.....	3

2.2.1.4 USOS.....	5
2.2.1.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	5
2.2.2 ASCARIDOL.....	6
2.2.2.1 TOXICIDAD.....	7
2.2.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A LA IONIZACIÓN DE LLAMA (FID).....	7
2.2.3.1 PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA.....	7
2.2.3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	7
2.2.3.3 COMPONENTES Y PROCESO DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-FID.....	8
2.2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	9
2.2.4.1 PROPÓSITO DE LA VALIDACIÓN.....	9
2.2.4.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	10
2.2.4.2.1 ESPECIFICIDAD.....	10
2.2.4.2.2 LINEALIDAD/SENSIBILIDAD.....	10
2.2.4.2.3 EXACTITUD.....	11
2.2.4.2.4 PRECISIÓN.....	11
2.2.4.2.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXANICO DE <i>C. ambrosioides</i>	13
3.1.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	13
3.1.2 PESADA, SECADA Y TRITURADA DE LA PLANTA.....	13
3.1.3 MACERACIÓN.....	13

3.1.4 CONCENTRACIÓN.....	14
3.2 CONDICIONES DEL METODO CROMATOGRAFICO.....	14
3.2.1 AUTOINYECTOR.....	14
3.2.2 INYECTOR.....	14
3.2.3 COLUMNA.....	15
3.2.3.1 RAMPA DE PROGRAMACIÓN.....	15
3.2.4 DETECTOR.....	15
3.2.5 CONDICIONES DE LOS GASES.....	16
3.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	16
3.3.1 PREPARACIÓN DEL ESTANDAR INTERNO.....	16
3.3.2 PREPARACIÓN DEL ASCARIDOL.....	16
3.3.3 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HEXANICO.....	16
3.4 ESPECIFICIDAD.....	17
3.5 LINEALIDAD/ SENSIBILIDAD.....	17
3.5.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	17
3.6 EXACTITUD.....	17
3.7 PRECISIÓN.....	18
3.7.1 REPETITIVIDAD.....	18
3.7.2 REPRODUCIBILIDAD.....	18
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXANICO DE <i>C. ambrosioides</i>	19

4.1.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	19
4.1.2 RENDIMIENTO DEL EXTRACTO.....	19
4.2 ESPECIFICIDAD.....	20
4.3 LINEALIDAD/SENSIBILIDAD.....	20
4.4 EXACTITUD.....	22
4.5 PRECISIÓN.....	23
V. CONCLUSIONES.....	25
VI. RECOMENDACIONES.....	26
VII. ANEXOS.....	27
7.1 ANEXO 1: CROMATOGRAMA DE ASCARIDOL AL AMBIENTE.....	27
7.2 ANEXO 2: CROMATOGRAMA DE ASCARIDOL REFRIGERACIÓN.....	27
7.3 ANEXO 3: CROMATOGRAMA DEL SOLVENTE (ETANOL).....	28
7.4 ANEXO 4: CROMATOGRAMA DEL SOLVENTE Y ESTANDAR INTERNO (NAFTALENO).....	28
7.5 ANEXO 5: CROMATOGRAMA CONCENTRACIÓN 5 mg/ml.....	29
7.6 ANEXO 6: CROMATOGRAMA CONCENTRACIÓN 12.5 mg/ml.....	29
7.7 ANEXO 7: CROMATOGRAMA CONCENTRACIÓN 25 mg/ml.....	30
7.8 ANEXO 8: CROMATOGRAMA CONCENTRACIÓN 50 mg/ml.....	30
7.9 ANEXO 9: CROMATOGRAMA CONCENTRACIÓN 75 mg/ml.....	31
7.10 ANEXO 10: CROMATOGRAMA CONCENTRACIÓN 100 mg/ml.....	31
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	32

Development and validation of an analitic method for determine ascaridole in the hexanic extract of *Chenopodium ambrosioides* (Paico) by gas- chromatography-FID

Loreto Burneo¹, Santiago Ojeda²

^{1,2} Instituto de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto s/n.

Postal Code 11 01 608, Loja – Ecuador.

email: mlburneo@utpl.edu.ec; esojeda@utpl.edu.ec

ABSTRACT

A method to determine ascaridole in the hexanic extract of *Chenopodium ambrosioides* was developed based in gas chromatography-FID using as internal standard naphthalene. Excellent linearity was found to be from 5 to 100 mg/mL. The precision was less than 2% and a precision less than 0.62 %. The recovery of this compound was 98, 35% with a CV less than 2%. The method was successfully validated for determine ascaridole using GC/FID.

Keywords: *ascaridole, gas- chromatography -FID, anthelmintic.*

INTRODUCTION

The monoterpene ascaridole is an endoperoxide that was isolated for first time from the "paico" by steam distillation of water by Nelson & Wallach. After this, Beckett et al, isolated and purified using a splitter chromatographic column filled with silica gel and identified it as ascaridol (also known as ascarisin; 4-peroxid-p-ment-2-eno o 1,4-epidioxi-p-mentano), which

molecular formula is C₁₀H₁₆O₂ and molecular weight 168.23 mol, its main physic properties are (ND20 °C 1.4733, boiling point 37 - 38 °C / 0.15 Torr, 39 - 40 °C / 0.2 Torr; density 20 °C 1.0113; freezing point of 3.3 °C). The solubility of this compound is optimal in hexane, pentane, toluene, benzene, ethanol and castor oil.⁽¹⁾⁽²⁾

The ascaridole is the main pharmacologically active and volatile in gradual temperature C. ambrosioides

oil, (20-80%, according to the recollection zone). In vitro studies have shown that it is a potent inhibitor of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosome cruzi* y *Leishmania amazonensis*. Also, it has some antitumor functions for certain cellular lines (CCRF-CEM, HL60, MDA-MB-231) so, this means that ascaridole could works for cancer treatments.⁽³⁾⁽⁴⁾

In our project, a method for determine ascaridole in the hexanic extract of *Chenopodium ambrosioides* was developed based in gas-chromatography-FID (GC/FID), because specific information about the content of this anthelmintic in the Paico extract has not been found.

MATERIALS AND METHODS

Ascaridole (purity >99%) was purchased to Cley Chemxal Lui. Naphthalene (purity >98%) was obtained in Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ethanol (HPLC grade) and other reactives like water were obtained in Centrocasal (Quito, Ecuador).

Gas chromatography -FID

The analysis was performed by a GC/FID system consisted on an

SHIMADZU GC-214 gas chromatograph, equipped with injector AOC-20I, and GC solution 5.1. Software for the analysis of the information. Naphthalene was used as an internal standard and ethanol reactive degree as solvent.

A metil siloxane column of 60 m*0.25mm # RTX-1701 was used. Flame Ionization Detector (FID). Injector Split 10:100. Injection and detection temperatures of 250 °C. N₂/air mobile phase. At a of flow 35.1ml/min. The chromatography conditions were 100 °C 1 minute, then 4 °C/ min up to 220 °C, remaining 10 minutes at this temperature. Pressure of 100 kPa. Injection volume of 1 µl.

Extraction process

It was developed by dynamic maceration using hexane from the dry plant's material, and a subsequent concentration at 25 ° C.

Method validation

Specificity

The specificity was measured starting by individual injection under the same conditions of solvent (ethanol), ascaridol

standard and internal standard (naphthalene).

Linearity and Sensitivity

Concentrations of 5, 12.5, 25, 50, 75 and 100mg of ascaridole diluted in 1ml reactive grade of ethanol were prepared. From each one of those concentrations were taken 0.5 ml and to put a vial with 0.5 ml of naphthalene which concentration was of 1mg/ml of ethanol. Each concentration was injected for three times in the GC/FID and the output of those work to calculate the media for each one.

Precision and Accuracy

The technique of standard addition was used with three different concentrations, each one triple injected at three different days. Samples were prepared using the *C. ambrosioides* extract and the initial concentrations that were approximately of 40 mg/ml. adding 5, 10 y 15mg/mL of ascaridol (MR) to each one, 1:1 of SI was also added. For the reproducibility,

standard was not added, in two different days we used hexanic extract with ten chromatographic injections per analyst.

Recovery

It was obtained from the observed concentration of ascaridole based on the results gotten by the standard addition, over the expected concentration (45, 50 and 55 mg/mL) of those results and multiplied by 100.

RESULTS AND DISCUSSION

Hexane extract

It was obtained a performance of 0.9% of hexanic extract of *C. ambrosioides*.

Method validation

Specificity

The result was that both the solvent (ethanol) and the internal standard (naphthalene) not interfere with the ascaridole. (Fig. 1 and 2)

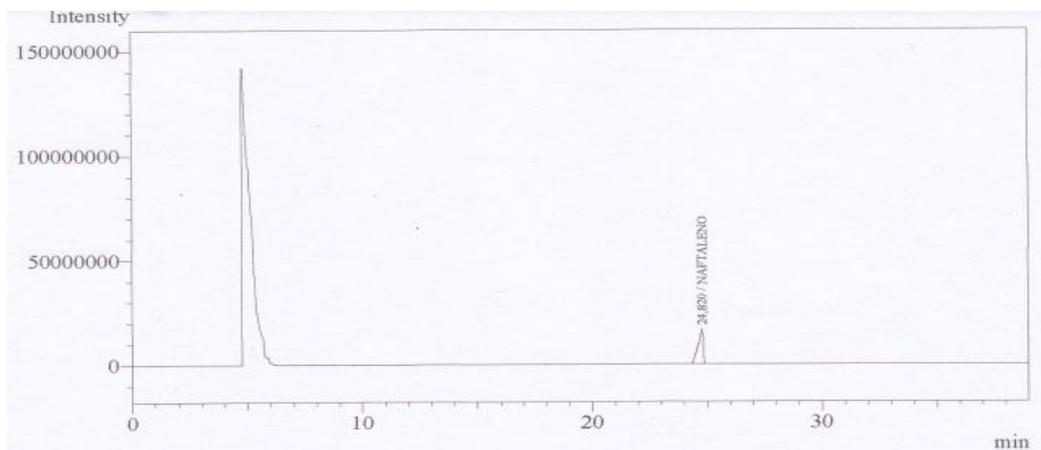


Fig 1. Solvent (ethanol) and internal standard, (naphthalene)

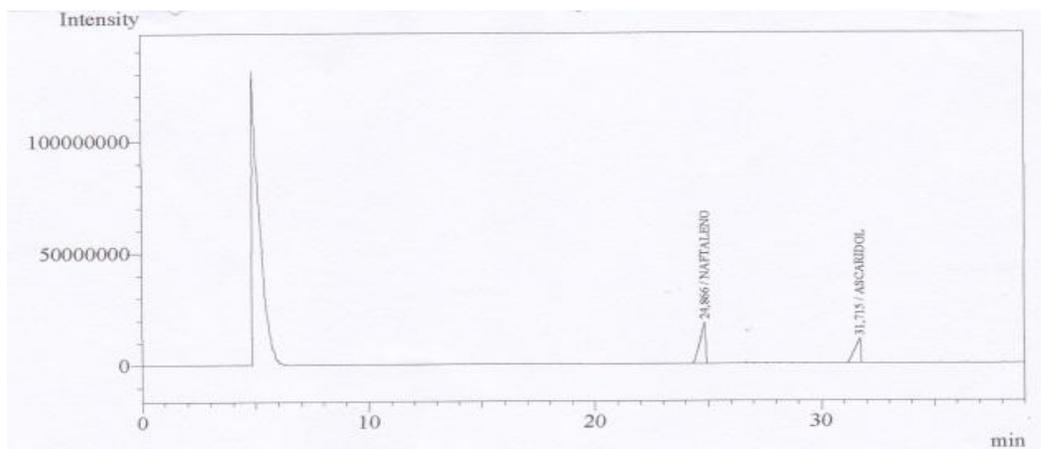


Fig 2. Chromatography of ascaridole and naphthalene, showing the especificity. The first top indicates the solvent used. The second indicates the naphthalene and the third top indicates the ascaridole.

Linearity and sensitivity

Results indicate that, in the concentration range comprised from 5 to 100mg/mL the conditions of instrumental linearity of the analytic method are satisfied because the requirements of a lineal determination of a ratio higher than 0.98 and a coefficient higher than 0.95 are satisfied.

By the way, it was estimated the intercept ($b = 0.261$) and the slope ($m = 0.212$), which gave us an equation of the fitted line: $Y = 0.212X - 0.261$, showing that both the slope and the intercept are different from zero. As shown in Table 1, we determined the coefficient of variation (CV) from the response factor (Y / X) which was 5.5%, that is less than the 20% established

and proving in this way that exists linearity in the studied working range.

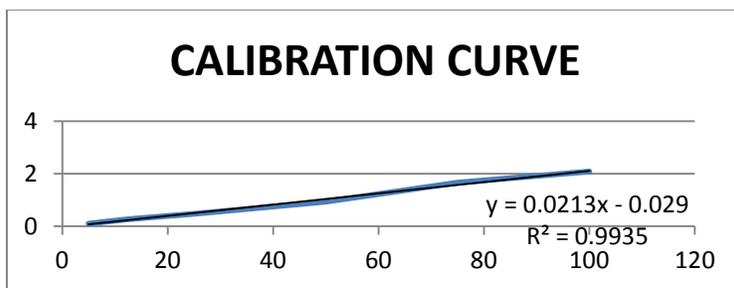


Fig. 3. Calibration curve

CONCENTRATION (mg/mL)	ÁREA	RESPONSE FACTOR (Y/X)
5	0.100552850	0.020309604
13	0.269469192	0.021594390
25	0.476552681	0.019212993
50	0.947193844	0.019202989
75	1.641299756	0.021712420
100	2.085509175	0.021096862
AVERAGE		0.020521543
% C.V.		5.511359217%

Table 1. Test de linealidad C.V global de factores de respuesta

Precision and Accuracy

To determine the methods precision and accuracy the coefficient of global variation should be less than 2%, (Table 2) Getting a repetitively result of CV 0.62% and reproducibility (Table 3) CV

of 0.56%. A $t_{97.5\%}$ has been established calculated of 1.53 lower than $t_{97.5\%}$ expressed as 2.02 with an interval of ± 0.52 . The precision is validated with 95% of confidence.

	CONCENTRATION (45mg/mL)	CONCENTRATION (50mg/mL)	CONCENTRATION (55mg/mL)
AVERAGE DAY 1	44.126	49.044	54.404
AVERAGE DAY 2	44.644	49.287	54.387
AVERAGE DAY 3	44.822	49.980	54.318
AVERAGE	44.531	49.437	54.370
R.S.D	0.362	0.486	0.046
C.V.%	0.813	0.983	0.084
COEFFICIENT OF VARIATION		0.6265%	

Table 2. Precision results between days. (Repetitively)

	ANALYST 1	ANALYST 2
AVERAGE DAY 1	38.9707	39.0544
AVERAGE DAY 2	39.2632	38.7216
AVERAGE	39.11695	38.888
R.S.D	0.20682873	0.23532514
CV%	0.52874453	0.60513561
AVERAGE	39.002475	
R.S.D	0.221076935	
C.V %	0.566940071	
t 97.5%	2.02	
T STUDENT 95%	1.538813924	
INTERVAL +/-	0.525462489	

Table 3. Precision results between days and analysts. (Reproducibility)

Recuperation

The recuperation percentage of global recuperation of the method is ascaridol is shown in (Table 4). The 98.3% with a CV less than 2%.

EXPECTED CONCENTRATION (mg/mL)	OBSERVED CONCENTRATION (mg/mL)	% RECOVERY	R.S.D %
45	44.1257	98.057	1.21673155
50	49.0437	98.087	0.81411602
55	54.404	98.916	0.93182247
% AVERAGE		98.353578	
% C.V		1.00428742	
% R.S.D		0.98755668	

Table 4. Results of the method recuperation.

CONCLUSIONS

It was established that the proposed method to determine the ascaridol in the hexane extract of *C. ambrosioides* by Gas Chromatography-FID is linear in the range of 5-100mg/ml with $t_{97.5}$ of 1.32 and based on the obtained value for the correlation coefficient, which was <2%.

Additionally, linearity was proved by determining the variation coefficient of response factors, it was confirmed that

the slope value is significantly different from 0 and that the intercept is not statistically remote from 0.

For accuracy, the percentage of the average recuperation is within the ranges and for the methodology precision the variation of the coefficient is less than 2%, same as the reproducibility CV. It was demonstrated that the average recovery rate is within the acceptance criteria, and that for the precision of the studied methodology it passed the repeatability tests when given a coefficient of variation of less than 2%, and also reproducibility tests given the CV less than 2%.

The analysis showed that the methodology that has been used satisfies the minimum parameters of linearity, accuracy and precision. So the method is validated.

REFERENCES:

1. Torres A et al (2003). Examen del Contenido en Ascaridol del Aceite Esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. (paico). *Faena*, Vol. 19, pp. 27-32.
2. The Merck Index, 11th Edition (1992) substance N°852, Rahway, N.J.
3. Cafferata L. (2005). Método Simple y Rápido para la Determinación de Ascaridol en Medio Acuoso Utilizando CLAE (RP-HPLC). *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 567-71.
4. Dembitsky V. et al (2008). Ascaridole and Related Peroxides from the Genus *Chenopodium*. *Biomed Pad Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub.* 152, (2):209-215.

ACKNOWLEDGMENT

My gratitude to CENTROCESAL for providing me its facilities to develop my research. Thanks to the UTPL for allowing me to develop the project in the laboratories of the IQA, likewise I want to extend my thanks to all the staff who work in the IQA. My gratefulness to Dr. Germánico Silva and to Dr. Carlos Lopez who selflessly managed to be my guide throughout the development of this research.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el desarrollo y validación del método analítico para la determinación de ascaridol en el extracto hexánico de *Chenopodium ambrosioides*, cuyos resultados fueron satisfactorios para los parámetros de linealidad, estabilidad, exactitud y precisión.

El método se desarrollo mediante cromatografía de gases-FID, en un equipo Shimadzu GC-214, equipado con autoinyector AOC-201 y cuyas condiciones cromatográficas principales fueron: volumen de inyección de 1µl, modo de inyección split a 250°C, presión de 100 kPa, una columna RTX-1701 a 100°C, temperatura del detector de 250°C.

Es así, que con un coeficiente de determinación lineal de 0.99, un coeficiente de variación de 5.5% y una ecuación de la recta ajustada $Y = 0.212 - 0.261$ la linealidad fue validada.

Mientras que para los parámetros de precisión y exactitud, luego de obtenerse un porcentaje de recuperación de ascaridol del 98.35%, coeficiente de variación <2%, y una $t_{calculada}$ menor a la expresada; se pudo concluir que el método propuesto para la determinación de ascaridol en el paico proporciona un alto grado de confianza, por lo que puede ser reproducible y tomado como base para futuras validaciones.

I. PRESENTACIÓN DEL FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 FIN DEL PROYECTO

El poder desarrollar y validar el método analítico mediante cromatografía de gases para el extracto de *Chenopodium ambrosioides*, con el fin de poder identificar y cuantificar al ascaridol como componente activo principal dentro de la formulación de cualquier forma farmacéutica desarrollada.

La Universidad Técnica y el IQA (Instituto de Química Aplicada) no poseen proyectos de investigación relacionados con la validación de métodos analíticos por lo tanto una de las motivaciones principales para realizar este trabajo fue el poder brindar las pautas necesarias para asegurar confiabilidad en los resultados obtenidos de cualquier producto o técnica realizada en los laboratorios, y la mejor forma de hacerlo es validando métodos analíticos.

1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO

Determinar las condiciones necesarias y adecuadas para la identificación del ascaridol en GC-FID y validar el método analítico con la finalidad de cuantificar la molécula activa en el extracto hexánico de *C. ambrosioides*.

1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO

- a. Obtención del extracto hexánico de *C. ambrosioides*
- b. Desarrollo de la curva de calibración.
- c. Determinación de la especificidad y sensibilidad del método.
- d. Determinación de la exactitud y precisión del método.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES

Desde los tiempos más remotos el hombre se ha interesado afanosamente para encontrar el medio de aliviar sus dolencias y enfermedades, desde épocas pretéritas hasta la actualidad, la naturaleza, nos ha ofrecido una flora oficial cuyas propiedades terapéuticas y medicinales sentaron la base de la medicina empírica y siguen colaborando con la medicina actual.¹

La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que el 80% de los más de 6.000 millones de habitantes de la tierra confían en las plantas medicinales para suplir sus principales necesidades de salud.²

El Ecuador no es la excepción puesto que el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se estima que el 80% de la población ecuatoriana emplea la medicina tradicional, pues está comprobado que muchos de los principios activos son una alternativa efectiva en el tratamiento de diversas enfermedades.³

En nuestro país se encontró que existen alrededor de 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas, usadas con fines medicinales, de las cuales el 75% son plantas nativas y el 5% son endémicas, el 11% son introducidas, el 16% son cultivadas y poseen además otros fines. De todas las especies medicinales el 26% son utilizadas para tratar infecciones e infestaciones, gran parte de esta categoría se utilizan para eliminar parásitos intestinales como lombrices y amebas. Las especies con mayor número de reportes son el paico (*C. ambrosioides*), el higuerón (*F. insípida*) y la papaya (*C. papaya*).¹

2.2 INTRODUCCIÓN

2.2.1 *Chenopodium ambrosioides*

¹ JUCAFRESA B. *Guía de la Flora Medicinal, toxica, aromática y condimenticia*. 1995. Madrid. Editorial Aedos.

² OMS. *Asamblea Mundial de la Salud*. 2007. Resolución WHA 58,27.

³ DE LA TORRE L; NAVARRETE H. *Enciclopedia de las plantas*. 2000. Espana.



Fig. 1. *C. ambrosioides*
Fuente: tusplantasmedicinales.com

2.2.1.1 Nombres comunes

Es conocida en Ecuador como paico o quenopodio, en países de Centroamérica como México y Guatemala es popularmente reconocida como epazote, paico macho, quenopodio, quenopodio vermífugo, pie de ganso, en Argentina y Perú se la llama yerba de Santa María o hierba olorosa, mastruz, en Brazil; y worm grass, Mexican tea, en EUA.⁴

2.2.1.2 Hábitat y Cultivo

Originario de la América tropical, se lo encuentra difundido por todo el mundo, en América Latina es común en los países de Perú, Bolivia, Ecuador, Brasil, Argentina y Paraguay. Se encuentra naturalizada en todas las regiones templadas del mundo. En Europa ha sido cultivada desde principios del siglo XVII para utilizarla como té, en donde se propagó, especialmente, por la región mediterránea.⁵

El paico ocupa un lugar preferente en la medicina indígena, entre los achuales, boras, candoshis, huitotos, ocaínas, yaguas y shipibos, para el tratamiento de los gusanos y lombrices. En Ecuador, las etnias Quichua, Siona y Kofán lo utilizan como purgante, obteniendo un jugo de las plantas aplastadas.³

Es cultivado con gran facilidad en climas tropicales, subtropicales y templados, y en suelos de cualquier tipo con abundante materia orgánica. Se propaga por semillas y esquejes, y se le puede sembrar durante todo el año, en asociación con hortalizas.³

2.2.1.3 Descripción botánica y morfología

Morfología: El paico pertenece a la familia Chenopodiaceae, clasificada dentro de las Angiospermas dicotiledóneas, cuyo género es el *Chenopodium*, el cual comprende alrededor de 120 especies, siendo la especie *ambrosioides* la más común.⁵

⁴ RÍOS M; KOZIOL M; PEDERSEN H; GRANDA G. (Eds). *Plantas Útiles del Ecuador*. 2007. Quito: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU, Universidad de Aarhus, Dinamarca, The Exotic Blends Company.

⁵ CERÓN C. *Plantas Medicinales de los mercados de Loja*. 2008. Quito : Escuela de Biología. Universidad Central

³ DE LA TORRE L; NAVARRETE H. *Enciclopedia de las plantas*. 2000. España.

Descripción botánica:

Hábito y forma de vida: Planta perenne, erguida o ascendente, glandulosa, más o menos pubescente.³

Tamaño: entre 40 cm a 1 metro de altura.

Tallo: Simple o ramificado, usualmente postrado.

Hojas: Pecioladas, oblongas a lanceoladas, de 3 a 10 cm de largo por 1 cm de ancho, gradualmente reducidas hacia la parte superior, subterceras o sinuado-dentadas y de color verde oscuro.⁴ (Ver Fig. 2)



Fig. 2. Hoja de *C. ambrosioides*
Fuente: conabio.com.mx

Inflorescencia: En forma de espiga con pequeñas flores verdes en panículos terminales densos, sésiles, cada una con cinco sépalos, y cuyo cáliz persistente circunda al fruto.⁴

Frutos y semillas: Fruto circular de casi 1 mm de ancho, envuelto por el perianto, pericarpio delgado que se desprende fácilmente, glanduloso; semilla horizontal o vertical, de unos 0.7 mm de diámetro, con el margen obtuso, negra, brillante y lisa.⁶ (Ver Fig. 3)



Fig. 3. Semilla de paico
Fuente: conabio.com.mx

⁶ SITIO WEB: <http://www.Herbotecnia.com.ar>.

⁴ RÍOS M; KOZIOL M; PEDERSEN H; GRANDA G. (Eds). *Plantas Útiles del Ecuador*. 2007. Quito: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU, Universidad de Aarhus, Dinamarca, The Exotic Blends Company.

³ DE LA TORRE L; NAVARRETE H. *Enciclopedia de las plantas*. 2000. Espana.

Plántulas: Hipocotíleo cilíndrico, de 8 a 20 mm, con o sin pelos; cotiledones sésiles, lineares, de 3.5 a 13 mm de largo y 0.5 a 1 mm de ancho, sin pelos; sin epicotíleo; hojas opuestas.⁶

Características especiales: Fuertemente olorosa y con olor penetrante.

2.2.1.4 Usos

Se le emplea contra múltiples padecimientos, que en general corresponden al aparato digestivo. Es útil en casos de parasitosis, donde se busca expulsar las lombrices mediante la ingestión, en ayunas, de la infusión de las ramas y en algunos casos de la raíz. Como antihelmíntico, es especialmente efectivo frente a áscaris y anquilostoma. También con frecuencia se le ocupa cuando hay dolor de estómago, diarrea o vómito.³

Otras alteraciones tratadas con el paico son los trastornos menstruales tales como: retención de la regla y menstruación escasa, para los cuales se toma la infusión de las ramas. Además, es utilizado para acelerar las contracciones uterinas durante el parto. Se dice que es útil contra picadura de alacrán y verrugas.⁷

Con menor frecuencia se le menciona contra diversos padecimientos, tales como: dolor de muelas, pulpitis, empacho, aire en el estómago, problemas de la vesícula biliar, acidez estomacal, como purgante, contra bronquitis, asma y catarro, contra el dolor de pecho y dolor de costado, inflamación de articulaciones, hinchazón por golpes, como diaforético, en hemorragias, para adquirir buena memoria y leer rápido y contra el "enfado".⁶

En el ámbito alimenticio se ocupan las hojas que se consumen como verdura en sopas, chupes y caldos. Así también las semillas se utilizan como aderezo en la preparación alimenticia.⁵

2.2.1.5 Composición Química

De las semillas, flores y hojas, se extrae tanto su extracto como su aceite esencial, el aceite es un líquido incoloro o ligeramente amarillo, de consistencia no muy viscosa, con olor penetrante parecido al alcanfor, con un sabor amargo, rico en monoterpenos y

⁷SITIO WEB: <http://www.peruecologico.com.pe>.

⁶SITIO WEB: <http://www.Herbotecnia.com.ar>.

³DE LA TORRE L; NAVARRETE H. *Enciclopedia de las plantas*. 2000. Espana.

⁵CERÓN C. *Plantas Medicinales de los mercados de Loja*. 2008. Quito : Escuela de Biología. Universidad Central

sesquiterpenos, cuyo compuesto mayoritario es el ascaridol (que le da propiedades antiparasitarias), p-cimeno(-), limoneno(+), alcanfor, artesona, safrol, n-docosano, n-hentriacontano, n-heptacosano, n-heptacosano, β pineno, metadieno, salicilato de metilo, dimetil sulfóxido, d terpineol y otros componentes. Posee actividad antihelmíntica (particularmente contra *A. lumbricoide*, *H. nana*, *Trichuris*), antifúngica (contra *A. fumigatus* y *C. trichoides*), depresora cardiaca, hipotensora, relajante muscular y estimulante respiratoria; disminuye la motilidad gástrica y tiene actividad espasmo lítica. Así también se ha comprobado que el extracto acuoso de esta especie inhibe el crecimiento de *S. áureus*.⁸

2.2.2 Ascaridol

El componente mayoritario del *C. ambrosioides* es un endoperóxido monoterpénico que fue aislado por primera vez del “paico” mediante arrastre con vapor de agua por Nelson & Wallach. Posteriormente Beckett *et al*, lo aislaron y purificaron en una columna cromatográfica separadora rellena con gel de sílice y lo identificaron como ascaridol (también conocido como ascarisin; 1,4-peróxido-p-ment-2-eno o 1,4-epidioxi-p-mentano), de fórmula molecular $C_{10}H_{16}O_2$ y peso molecular 168.23 mol, cuyas propiedades físicas principales son ($n_{20^{\circ}C}^D$ 1,4733; punto de ebullición 37°-38°C/ 0.15 Torr; 39°-40°C/ 0.2 Torr; densidad_{20°C} 1,0113; punto de congelamiento 3,3°C). La solubilidad de este compuesto es óptima en hexano, pentano, tolueno, benceno, etanol y aceite de castor.¹⁰

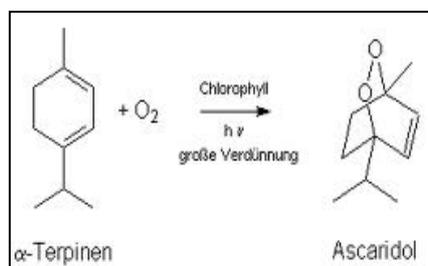


Fig. 4. Proceso de obtención de ascaridol
Fuente: chemikalienlexikon.de

El ascaridol constituye el principal principio farmacológicamente activo y relativamente volátil a temperatura ambiente del aceite esencial de *C. ambrosioides* (20-80%, según la zona de recolección). Estudios *in vitro* han demostrado que es un potente inhibidor de *Plasmodium falciparum*, *Tripanosoma cruzi* y *Leishmania amazonensis*, así como también

⁸ DEMBITSKY V. *et al*; *Ascaridole and Related Peroxides from the Genus Chenopodium*. Czech Repub : Biomed Pad Med Fac Univ Palacky Olomouc, 2008, Vol. 152. (2):209-215

⁹ CAFERATA L. JEANDUPEUX R. RIMADA R; *Metodo Simple y Rapido para la Determinacion de Ascaridol en Medio Acuoso Utilizando CLAE (RP-HPLC)*. Argentina : Acta Farm. Bonaerense , 2005, Vol. 24. 567:571.

¹⁰ TORRES AM; *Examen del contenido de Ascaridol del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides L. (Paico)*. Argentina : Facena, 2003, Vol. 19. 27-32.

posee actividad antitumoral contra ciertas líneas celulares (CCRF-CEM, HL60, MDA-MB-231) lo que hace del ascaridol un nuevo candidato para el tratamiento del cáncer.¹¹

2.2.2.1 Toxicidad

Varios reportes describen la aparición de efectos tóxicos producidos por la ingestión del aceite esencial, que en casos extremos llevó a la muerte a individuos intoxicados. En un caso se reporta la ingestión de 1 ml por una mujer adulta con la aparición de efectos nocivos; en otro, la ingestión de 5 ml de aceite por hombre adulto, provocó su muerte, al igual que un niño que ingirió 5 microcuries.⁹

Los síntomas que se presentan en los individuos intoxicados incluyen dolor de cabeza, mareo, náusea, vértigo, vómito, constipación, sordera temporal, ceguera, delirio, coma, convulsión, colapso circulatorio debido a parálisis vasomotora, problemas pulmonares y eventualmente, la muerte.¹⁰

2.2.3 Cromatografía de gases acoplada a la ionización de llama (GC- FID)

2.2.3.1 Principio de la cromatografía

La cromatografía es, esencialmente, un método físico de separación, en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases, la fase estacionaria, de gran área superficial y la fase móvil que se hace pasar a lo largo de la fase estacionaria. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra. La cromatografía como técnica analítica instrumental es capaz de proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de la composición una mezcla. Además, las especies separadas se pueden caracterizar empleando los detectores apropiados.¹²

2.2.3.2 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases a menudo se emplea para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada mediante la comparación del cromatograma de

¹¹ *The Merck Index*. Rahway, N.J : substance N 852 11va Edition, 1992.

⁹ CAFERATA L. JEANDUPEUX R. RIMADA R; *Metodo Simple y Rapido para la Determinacion de Ascaridol en Medio Acuoso Utilizando CLAE (RP-HPLC)*. Argentina : Acta Farm. Bonaerense , 2005, Vol. 24. 567:571.

¹⁰ TORRES AM; *Examen del contenido de Ascaridol del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides L. (Paico)*. Argentina : Facena, 2003, Vol. 19. 27-32.

¹² GUTIERREZ M.C. Y DROGUET. *La Cromatografía de Gases y la Espectrofotometría de masas: Identificación de Compuestos causantes de mal olor*. 122, España : Boletín Intexper U.P.C, 2002.

una sustancia pura con el de la muestra, siempre que las condiciones de obtención de ambos sean idénticas. Por otra parte, también se utiliza para establecer la cantidad de componentes individuales presentes en una muestra, empleando curvas de calibración de los correspondientes patrones.¹²



Fig. 5. Cromatógrafo de gases

Fuente: Catalogo Shimadzu

Atendiendo a la naturaleza de la fase móvil, se pueden distinguir dos tipos de cromatografía: cromatografía gaseosa y cromatografía líquida. En la cromatografía gaseosa (GC) el transporte de la muestra a través de la fase estacionaria (columna) se realiza con un gas inerte. Así, se pueden separar por esta técnica muestras volátiles. Para compuestos con poca volatilidad tales como moléculas grandes y altamente polares, suele emplearse la cromatografía líquida (LC), en la cual la fase móvil es un líquido en el cual los componentes de la muestra deben ser solubles, realizándose la mayoría de estas separaciones a temperatura ambiente.¹³

2.2.3.3 Componentes y proceso de la cromatografía de gases – FID.

En cromatografía de gases - FID, la muestra se inyecta en la **fase móvil**, la cual es un gas inerte (He, N₂, H₂). En esta fase los distintos componentes de la muestra pasan a través de la **fase estacionaria** que se encuentra fijada en una columna. La **columna** se encuentra dentro de un **horno** con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente y en consecuencia su tiempo de retención, se da en función de la distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria.¹²

¹³ **HARRIS D;** *Análisis Químico Cuantitativo*. 2003. Barcelona : Editorial Reverte.

¹² **GUTIERREZ M.C. Y DROGUET.** *La Cromatografía de Gases y la Espectrofotometría de masas: Identificación de Compuestos causantes de mal olor*. 122, Espana : Boletín Intexper U.P.C, 2002.

Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente por la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos, en general a mayor presión, menor tiempo de retención en la columna. Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diferentes componentes de la muestra se separan dando picos y áreas que pueden ser medidos cualitativa y cuantitativamente con la ayuda de un detector como FID.¹²

El **detector FID** es básicamente un quemador de hidrogeno/oxígeno en donde se mezcla el eluente de la columna (gas portador y analito) con hidrogeno produciendo una llama de alta temperatura que piroliza a los compuestos orgánicos lo que produce iones y electrones, que son conductores eléctricos, que van desde la punta del quemador (ánodo) a un conductor catódico. Esta corriente eléctrica es la señal que da el detector.¹³

Existen tres técnicas básicas de **inyección** Split y Split-less y on column, las dos primeras consisten en inyectar y vaporizar la muestra en una cámara de vaporización. El sistema **split** desvía la mayor parte de la muestra fuera del cromatógrafo y envía solo una pequeña fracción a la columna; mientras que, split-less dirige toda la muestra a la columna. La inyección on column se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización que podría producir la descomposición de los productos termolábiles.¹³

2.2.4 Validación de métodos analíticos

2.2.4.1 Propósito de la validación

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos y se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.¹⁴

La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico ya que debe realizarse con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento,

¹⁴ **HERNANDEZ B; CASTILLO A; GONZALEZ R;** *Protocolo de validacion de metodos analiticos para la cuantificacion de farmacos.* Cuba : Revista Cubana de Farmacia, 1996, Vol. 30.

¹³ **HARRIS D;** *Analisis Quimico Cuantitativo.* 2003. Barcelona : Editorial Reverte.

¹² **GUTIERREZ M.C. Y DROGUET.** *La Cromatografia de Gases y la Espectrofotometria de masas: Identificacion de Compuestos causantes de mal olor.* 122, Espana : Boletin Intexper U.P.C, 2002.

lo que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer y mediante el cual se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas.¹⁵

2.2.4.2 Parámetros de la validación

Para demostrar que un método es adecuado para la aplicación que se pretende es preciso determinar mediante estudios de laboratorio sus parámetros o características de funcionamiento, cuando se trata de determinar cuantitativamente a un componente los parámetros a definir son:

2.2.4.2.1 Especificidad

Es la habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y en la cuantificación del o los analitos de que se trate. También mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método. La validación debe garantizar el buen funcionamiento del método, y que éste distinga los efectos de las impurezas, las sustancias que reaccionan entre sí, etc., que podrían estar presentes en la matriz.¹⁶

2.2.4.2.2 Linealidad / Sensibilidad

La sensibilidad de un método o un instrumento, mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Está delimitada por dos factores: la pendiente de la curva de calibración y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida. Tradicionalmente se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de trabajo. El rango de trabajo (ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra) viene definido por la finalidad del método y puede representar sólo una parte de la totalidad de la línea recta. La curva de calibración o recta de calibrado es construida con cantidades conocidas de una sustancia y se utiliza para determinar la concentración de esta sustancia presente en una

¹⁵ **FERNÁNDEZ A; AGUILERA Y; MORALES I; ALONSO E;** *Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe.* Cuba : Rev Cubana Farm , 2002, Vol. 36.

¹⁶ **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURE: TEXT AND METHODOLOGY Q2R1.** 2005

muestra incógnita cuando se interpolan sus señales a dicha recta. Se recomienda un mínimo de cinco concentraciones para elaborarla.¹⁷

Habitualmente los criterios de aceptación implican una prueba de la “bondad de ajuste”. Frecuentemente se utiliza como criterio de la linealidad un coeficiente de correlación (r^2), del 0,99.¹⁸

2.2.4.2.3 Exactitud

Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, y el valor encontrado obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces. La diferencia que existe entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, es debida a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente este parámetro se expresa como el porcentaje de recuperación del analito en la muestra por ensayo.¹⁴

Lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas que se encuentren dentro del rango de trabajo. La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta.¹⁶

2.2.4.2.4 Precisión

Es el grado de acercamiento o dispersión entre resultados analíticos individuales obtenidos con patrones de control preparados independientemente cuando el método se aplica repetidamente a múltiples muestras de una mezcla homogénea, se expresa como el por ciento de la desviación estándar relativa de un número de muestras estadísticamente significativas, depende de la concentración y debe medirse con concentraciones diferentes dentro del rango aceptado. Una precisión aceptable es del 20%. Con concentraciones más altas la precisión debe ser mayor. La precisión da idea de los errores aleatorios.¹⁹

Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles.

¹⁷ UNODC. *Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos.* Nueva York : UNODC, 2010.

¹⁸ *GUÍA DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS*

¹⁹ TRILLO FAULI I. *Tratado de Farmacia Galenica.* Madrid : Tratado F 2000, 1993.

Repetitividad: Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo o los mismos materiales y en el mismo laboratorio.²⁰

Reproducibilidad: es la dispersión de resultados de ensayos mutuamente independientes utilizando el mismo método aplicado a alícuotas de la misma muestra en diferentes condiciones: distintos operadores, diferente equipamiento o diferentes laboratorios.¹⁷

2.2.4.2.5 Limite de cuantificación

Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito, cuya relación señal ruido es de 10:1.¹⁶

²⁰ **OAA. Organismo Argentino para la Acreditación.** *GUIA PARA VALIDACION DE METODOS DE ENSAYO.* 2003.

¹⁷ **UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.** *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos.* Nueva York : UNODC, 2010.

¹⁶ **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN.** *ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURE: TEXT AND METHODOLOGY Q2R1.* 2005

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención del extracto hexánico de *C. ambrosioides*

3.1.1 Recolección del material vegetal

El material fue adquirido en el mercado Gran Colombia de la ciudad de Loja, escogiendo las plantas enteras en mejor estado y de color verde oscuro. La cantidad recolectada fue de 1153 gramos de materia húmeda.

3.1.2 Pesada, secada y triturada de la planta

Se procedió a pesar todo el material recolectado y se colocó en la estufa a 29 °C durante 3 días, que fue el tiempo necesario para que todas las plantas estén completamente secas.

Se pesó nuevamente las plantas para poder determinar la humedad, se cortaron los tallos y trituraron las hojas, flores y semillas. Todo este material vegetal fue colocado en un recipiente boca ancha de vidrio con hexano en una proporción de material vegetal/solvente 1:4; es decir, 638,45 gr. de paico y 2400 mL de hexano.

3.1.3 Maceración

Se realizó una maceración dinámica durante 7 días y con 3 recolecciones distribuidos así:

Recolección 1: se dejó reposar el material vegetal con el hexano durante 48 horas y se realizó la maceración dinámica durante 12 horas. El solvente se recolectó y filtró para su posterior concentración.

Recolección 2: se colocó nuevamente hexano y se dejó reposar durante 36 horas, después de este tiempo se realizó maceración dinámica durante 10 horas, se recolectó y filtró el solvente.

Recolección 3: se colocó hexano y se dejó reposar durante 36 horas, se realizó una maceración dinámica de 10 horas, se recolectó y filtró el solvente.

3.1.4 Concentración

Una vez filtrado todo el solvente que se recolectó se procedió a concentrar en el rotavapor con una temperatura de 25 °C hasta que se obtuvo una especie de jarabe poco viscoso y de color amarillo oscuro, al cual se lo pesó y se colocó en refrigeración.



Fig. 4. Proceso de obtención del extracto de *C. ambrosioides*
Fuente: Verónica Briceño

3.2 Condiciones del método cromatográfico

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases marca SHIMADZU GC-214 equipado con inyector AOC-20I y el software de análisis de datos fue GC solution 5.1

3.2.1 Autoinyector (AOC-20i+s)

AOC-20i+s	
Volumen de inyección	1.0 µL de 10.0 µL
# de enjuagues con solvente (pre-run)	1
# de enjuagues con solvente (post-run)	1
# de enjuagues de la muestra	2
Velocidad de succión	Alta
Tiempo comp. Viscosidad	0.2 sec.
Velocidad de inyección	Alta
Velocidad de inserción de la jeringa	Alta
Modo de inyección	Normal

Cuadro 1. Condiciones del autoinyector

3.2.2 Inyector (SPL 1)

SPL 1	
Temperatura	250°C
Modo de inyección	Split
Gas portador N₂/aire	

Modo para el control de flujo	Presión
Presión	100 kPa
Flujo total	35.1 mL/min
Flujo de la columna	2.92 mL/min
Velocidad lineal	49.0 cm/sec
Flujo de purga	3 mL/min
Relación de inyección	10

Cuadro 2. Condiciones del inyector

3.2.3 Columna (RTX-1701)

Temperatura	100°C
Tiempo de equilibrio	3 min
Información de la columna RTX-1701	
Número de serie	162769
Temperatura máxima	350°C
Longitud	60 m
Diámetro interno	0.32
Grosor de la película	0.25 µm
Características	Capilar, tubular abierta, de sílice fundida y polaridad media
Composición	Crossbond®14%, cyanopropylphenyl/86% y dimetilpolisiloxano

Cuadro 3. Condiciones de la columna

3.2.3.1 Rampa de programación

Incremento (°C)	Temperatura (°C)	Mantenimiento (min)
-	100	1
4	220	8
Tiempo total:		39 min

Cuadro 4. Rampa de programación

3.2.4 Detector (SFID1)

SFID1	
Temperatura	250 °C
Señal de adquisición	

Frecuencia de señal	40 msec
Parada	39 min
Enlace del programa con el horno	
Tiempo de retardo	0.0 in

Cuadro 5. Condiciones del detector

3.2.5 Condiciones de los gases

Condiciones de los Gases	
Gas	Presión
Nitrógeno (N ₂)	110 kPa
Helio (He)	60 kPa
Aire	50 kPa

Cuadro 6. Condiciones de los gases

3.3 Preparación de muestras

Se realizaron dos pruebas bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas. La primera fue del ascaridol como estándar (MR) y la segunda fue del extracto hexánico de *C. ambrosioides* (Ex) para determinar la concentración de ascaridol en esta muestra. Ambas muestras fueron diluidas con etanol y se les agregó solución de naftaleno como estándar interno (SI) en relación 1:1.

- 3.3.1 Preparación del estándar interno (SI):** se pesó 500 mg de naftaleno y se disolvió con 10 mL de etanol grado reactivo, obteniendo una concentración de 50 mg/mL.
- 3.3.2 Preparación de ascaridol (MR):** se colocó en un vial 50 µL de ascaridol y 950 µL de etanol grado reactivo. De esto se tomaron 500 µL y se le añadió 500 µL de SI, para obtener una concentración de 25 mg/mL. **Nota:** la densidad es de 1.0 por lo tanto µL equivalen a mg.
- 3.3.3 Preparación del extracto hexánico (Ex):** se pesó 5840 mg del extracto de *C. ambrosioides* y se disolvió con 20 mL de etanol grado reactivo. De esto se tomaron 500 µL y se agregó otros 500 µL de SI.

Las muestras MR y Ex fueron inyectadas en el cromatógrafo de gases para determinar la presencia de ascaridol y la concentración de este analito en el extracto hexánico, lo que fue comprobado mediante la comparación de picos y tiempos de retención de MR y Ex.

3.4 Especificidad

La especificidad se determinó mediante inyecciones individuales del solvente, SI y MR, tanto el SI como el MR fueron diluïdos con etanol (solvente), mientras que MR también contenía al SI. Las muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones cromatografías en dos días distintos, el primer día las muestras permanecieron al ambiente y en el segundo día las muestras permanecieron en refrigeración.

3.5 Linealidad/ Sensibilidad

La curva de calibración fue obtenida con 6 puntos a partir de distintas concentraciones del ascaridol (MR) en el rango de 5-100 mg/mL. Este rango se estableció debido a la concentración obtenida de la muestra Ex fue cercana a 40 mg/mL y la Eurachem aconseja que el rango lineal debe estar entre el 10 y 150%.

3.5.1 Preparación de muestras: todos los puntos para la recta de calibrado se prepararon de manera individual así:

- Punto 1: se tomó 10 µL de ascaridol y se agregó 990 µL de etanol 99 %.
- Punto 2: se tomó 25 µL de ascaridol y se agregó 975 µL de etanol 99 %.
- Punto 3: se tomó 50 µL de ascaridol y se agregó 950 µL de etanol 99 %.
- Punto 4: se tomó 100 µL de ascaridol y se agregó 900 µL de etanol 99 %.
- Punto 5: se tomó 150 µL de ascaridol y se agregó 850 µL de etanol 99 %.
- Punto 6: se tomó 200 µL de ascaridol y se agregó 800 µL de etanol 99 %.

De cada uno de los puntos se tomaron de manera individual 500 µL y se les añadió 500 µL de SI, obteniendo con concentraciones de 5 - 12.5 – 25 – 50 – 75 y 100 mg/mL para cada punto respectivamente. Cada una de estas concentraciones fueron inyectadas en el cromatógrafo de gases bajo las mismas condiciones durante tres días distintos para determinar que existe la linealidad instrumental y del método.

3.6 Exactitud

Se utilizó la técnica de adición de estándar con 3 concentraciones distintas inyectadas por triplicado. Las muestras se prepararon a partir del extracto de *C. ambrosioides*, utilizando la misma concentración inicial que era cercana a 40 mg/mL y añadiendo cantidades conocidas de 5-10 y 15 mg/mL de ascaridol (MR) a cada una. De tal manera que del extracto ya

preparado (Ex) se colocaron 500 μL en nueve viales diferentes y se agregaron 500 μL del IS. A 3 viales se les añadió 5 μL de ascaridol puro, a otros 3 viales se les añadió 10 μL y a los 3 viales restantes se les adicionó 15 μL , quedando así concentraciones esperadas de 45, 50 y 55 mg/mL de ascaridol respectivamente. Se estableció que el porcentaje de recuperación para determinar la exactitud del método debe estar entre 95-105 %.

3.7 Precisión

En este parámetro intervienen dos condiciones la repetitividad y la reproducibilidad.

3.7.1 Repetitividad: para determinar este parámetro se utilizó las mismas condiciones y metodología analizadas en la exactitud, pero en 3 días diferentes y por el mismo operario, lo que sirve para determinar que el método funciona.

3.7.2 Reproducibilidad: para este parámetro se trabajó a partir del extracto hexánico. Fue realizado de manera individual por dos analistas distintos y en dos días diferentes. Cada día el analista 1 y 2 prepararon 10 viales diferentes a partir de la solución de Ex, para lo cual cada analista colocó 500 μL de Ex en cada uno de los viales y agregó 500 μL del SI que fueron inyectados de manera simultánea en el cromatógrafo de gases.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del Extracto Hexánico de *C. ambrosioides*

4.1.1. Determinación de humedad

El peso de la muestra húmeda del paico fue de 1153 gr. y el peso del material seco fue de 638.45 gr., lo que dió como resultado una humedad del 44,62 %.

$$\text{Humedad} = \frac{\text{pmh} - \text{pms}}{\text{pmh}} * 100$$

$$\text{Humedad} = \frac{1153 \text{ gr} - 648.45 \text{ gr}}{1153 \text{ gr}} * 100$$

$$\text{Humedad} = 44,62 \%$$

4.1.2 Rendimiento del extracto

A partir de 638,45 gr. de materia vegetal seca de *C. ambrosioides* se obtuvieron 5,76 gr. de extracto hexánico del paico, por lo que el rendimiento del extracto hexánico fue igual al 0,9 %.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{gr de extracto obtenido}}{\text{gr de materia seca}} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{5,76 \text{ gr}}{638.45 \text{ gr}} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = 0.9 \%$$

Este resultado es bajo comparado con los resultados obtenidos a partir del extracto etanólico de *C. ambrosioides* cuyo rendimiento fue 5,61 %.²¹ No obstante este valor sólo refleja el porcentaje de extracto obtenido más no la concentración de ascaridol en el mismo. Al comparar los cromatogramas de ambos extractos se encontró que la concentración de ascaridol en el extracto etanólico era muy baja, menor a 0,001 mg/mL y en el extracto hexánico se encontraba alrededor de 40 mg/mL. Varios autores mencionan que el punto de ebullición del ascaridol se encuentra entre el 37-40 °C motivo por el cual la temperatura al extraer y concentrar el extracto es determinante, así

también se debe tomar en cuenta que el ascaridol es sumamente volátil por lo tanto es susceptible de pérdida en los compuestos.¹¹

4.2 Especificidad

Los resultados obtenidos fueron que ni el estándar interno de naftaleno ni el solvente interfieren con el ascaridol, debido a que los tiempos de retención se mantienen constantes en ambos días y para ambos casos, es decir para temperatura ambiente y para las muestras en refrigeración. (Ver Anexo 1-4)

Con estos resultados se pudo determinar que el método es selectivo porque ningún otro compuesto (etanol ni SI) interfiere y que existe especificidad en cuanto que al variar las condiciones de almacenamiento los resultados fueron similares. Sin embargo, para corroborar este último parámetro una buena alternativa sería variar las condiciones cromatográficas como por ejemplo el modo de inyección, el gas transportador, la presión, la temperatura del detector, inyector o columna. Aunque esto no cuenta con respaldo suficiente para ser demostrado, se puede decir que al variar estas condiciones en la puesta a punto del método los resultados mostraron variación solamente en los tiempos de retención y por lo tanto en el tiempo de corrida.

A continuación se indican los resultados obtenidos en este parámetro:

Día 1: Muestra en Refrigeración	
Compuesto	Tiempo de retención
Etanol	5.01
Naftaleno	24.82
Ascaridol	31.71

Cuadro 7. Especificidad día 1.

Día 2: Muestra al Ambiente	
Compuesto	Tiempo de retención
Etanol	5.01
Naftaleno	24.80
Ascaridol	31.41

Cuadro 8. Especificidad día 2.

4.3 Linealidad/ Sensibilidad

Para este parámetro se establecieron los siguientes criterios de aceptación:

- Coeficiente de correlación de la regresión lineal (r) debía encontrarse entre 0.98 y 1.00 y el coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.95.
- Coeficiente de variación (C.V) de los factores de respuesta menor al 20 %.
- Pendiente distinta de cero.
- Intercepto distinto de cero.

Los cálculos se realizaron en Excel 2010 y se obtuvieron los siguientes resultados:

- Coeficiente de determinación $R^2 = 0.9950554$
- Coeficiente de determinación lineal $r = 0.9982257$
- Pendiente = 0.0212
- Intercepto = 0.0261

Los resultados indican que el modelo ajustado, cumple con la ley de Beer y es capaz de explicar la respuesta (área) a partir de la variable concentración. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 5 mg/mL a 100 mg/mL se satisfacen las condiciones de linealidad instrumental del método analítico, ya que se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal (r) mayor a 0.98 y un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.95, lo que indica que existe correspondencia entre los valores obtenidos con la curva de calibración con los obtenidos experimentalmente como se explicara mas adelante.

Por otra parte, se estimo el intercepto ($b = 0.261$) y la pendiente ($m = 0.212$), lo que nos dio una ecuación de la recta ajustada: $Y = 0.212X - 0.261$, demostrando que tanto la pendiente como el intercepto son distintos de cero. También se determino el coeficiente de variación a partir del factor de respuesta (Y/X) que fue del 5.5% siendo menor al 20% establecido y comprobando así que si existe linealidad en el intervalo de trabajo estudiado.

CONCENTRACION (mg/mL)	AREA	FACTOR DE RESPUESTA (Y/X)
5	0.100552850	0.020309604
13	0.269469192	0.021594390
25	0.476552681	0.019212993
50	0.947193844	0.019202989
75	1.641299756	0.021712420
100	2.085509175	0.021096862
	PROMEDIO	0.020521543
	DESVIACION ESTANDAR	0.001131016
	COEFICIENTE DE VARIACION	5.511359217

Cuadro 9. Test de linealidad C.V global de factores de respuesta.

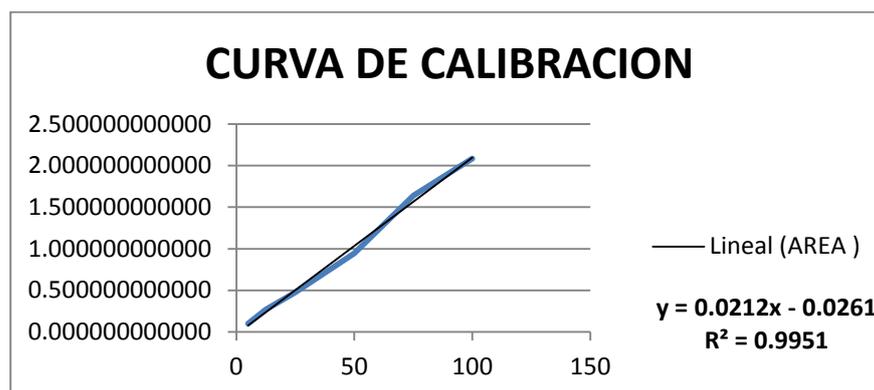


Gráfico 1. Curva de calibración global ajustada por el método de mínimos cuadrados.

4.4. Exactitud

La exactitud mide el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en el diseño experimental de los materiales de referencia (estándares) y/o materiales de trabajo (extracto), con los valores teóricos de los mismos.

Para comprobarlo es necesario determinar el % de recuperación, teniendo como criterio de aceptación que debe encontrarse entre 95–105%. La recuperación del método se calcula a partir de las concentraciones observadas y las concentraciones esperadas así:

$$\% \text{ Recuperacion} = \frac{C. \text{ observada}}{C. \text{ esperada}} \times 100$$

El porcentaje de recuperación global fue del 98,35% lo que indica que el método propuesto muestra la exactitud necesaria para considerarlo adecuado para la determinación de ascaridol en el extracto hexánico de *C. ambrosioides*. Así también se determinó un C.V de 1.004% siendo menor al 2% lo que nos permite dar conformidad al resultado y dar como validado este parámetro.

MUESTRA	CONCENTRACION DE LA MUESTRA INICIAL (mg/mL)	CONCENTRACION DEL ESTANDAR (mg/mL)	CONCENTRACION ESPERADA (mg/mL)	CONCENTRACION OBSERVADA (mg/mL)	% RECUPERACION	C.V %
				43.354	96.342	
1	40	5	45	44.567	99.038	1.241
				44.456	98.791	
				MEDIA	98.057	
				48.908	97.816	
2	40	10	50	48.627	97.254	0.830
				49.596	99.192	

				MEDIA	98.087	
				55.098	100.178	
3	40	15	55	53.876	97.956	0.942
				54.238	98.615	
				MEDIA	98.916	
% RECUPERACION GLOBAL		98.353				
% C.V GLOBAL		1.0042				

Cuadro 10. Evaluación de la exactitud del método analítico

4.5 Precisión

En este parámetro se midió tanto la repetitividad como la reproducibilidad del método entre día y entre analista. Para estos estudios los criterios de aceptación establecidos fueron un coeficiente de variación < 2% y una $t_{97.5\%}$ cal menor a la $t_{97.5\%}$ expresada. Para determinar la repetitividad se utilizaron las mismas concentraciones que la exactitud en tres días distintos y por dos analistas distintos, como se puede observar en el cuadro 11, el coeficiente de variación global fue del 0.62% siendo menor al 2% establecido según la ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) lo que nos da como resultado la validación de este parámetro. Para determinar la reproducibilidad del método se trabajo con el extracto hexánico del paico y se evaluó la precisión del método entre analistas y entre días como se muestra en el cuadro 12, se obtuvo un coeficiente de variación global de 0.56% inferior al 2% establecido y una $t_{97.5\%}$ calculada de 1.53 menor a la $t_{97.5\%}$ expresada de 2.02 con un intervalo de confianza de +/- 0.52.

	CONCENTRACION 1 (45mg/mL)	CONCENTRACION 2 (50mg/mL)	CONCENTRACION 3 (55mg/mL)
DIA 1 PROMEDIO	44.12566667	49.04366667	54.40400000
DIA 2 PROMEDIO	44.64366667	49.28666667	54.38700000
DIA 3 PROMEDIO	44.82233333	49.98033333	54.31800000
PROMEDIO	44.53055556	49.43688889	54.36966667
DESV. STAN	0.3618448614	0.4860670202	0.0455448497
C.V	0.812576571	0.983207138	0.08376886
COEFICIENTE DE VARIACION PROMEDIO	0.626517523 %		

Cuadro 11. Resultados de la precisión entre días (Repetitividad)

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1 PROMEDIO	38.9707	39.0544
DIA 2 PROMEDIO	39.2632	38.7216
PROMEDIO	39.11695	38.888
DESV. STD	0.20682873	0.23532514
CV	0.52874453	0.60513561
PROMEDIO GLOBAL	39.002475	
DESV. STD GLOBAL	0.221076935	
C.V GLOBAL	0.566940071 %	
t 97.5%	2.02	
T STUDENT 95%	1.538813924	
INTERVALO +/-	0.525462489	

Cuadro 12. Resultados de la precisión entre días y entre analistas (Reproducibilidad)

V. CONCLUSIONES

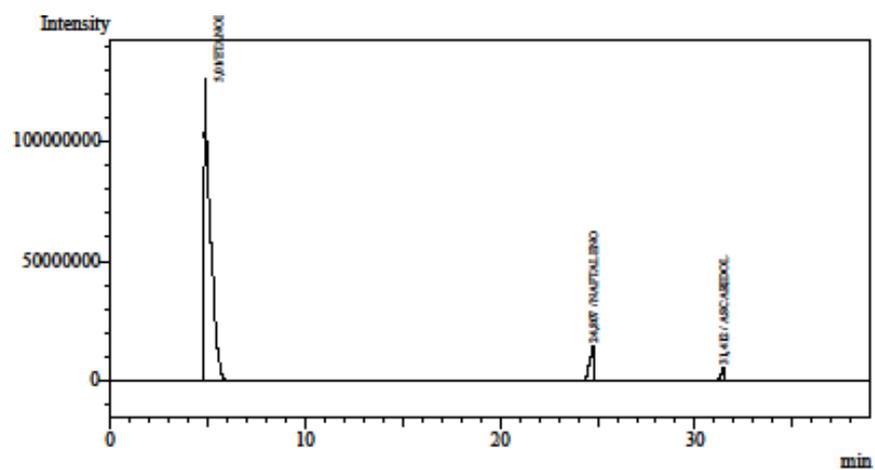
- El método desarrollado para determinar ascaridol en el extracto hexánico del paico fue validado debido a que cumple con los criterios de aceptación propuestos, concluyendo así que el presente método puede ser reproducible siempre que se mantenga las mismas condiciones de trabajo establecidas.
- Los resultados obtenidos para la repetitividad y para la reproducibilidad demuestran que el método cumple con las especificaciones y puede ser aplicado con seguridad y eficiencia.
- El proceso de validación nos asegura que un método analítico es exacto y preciso, por lo que puede ser utilizado como referencia para el análisis de un compuesto en diferentes laboratorios.
- La precisión y veracidad de cada método de ensayo se establecen durante la validación del mismo pero en la práctica cotidiana el laboratorio deberá demostrar que es capaz de mantener de forma estable estos niveles de desempeño mediante procedimientos de control de calidad de los resultados.
- En la provincia de Loja existe un alto consumo, sobre todo en la población rural, así como también un amplio conocimiento sobre los usos medicinales del paico, muchos consideran a más de sus propiedades antiparasitarias propiedades tales como el mejoramiento de la capacidad de recordar las cosas, manifiestan que el oler el paico les ayuda a mejorar su memoria y concentración.
- En la actualidad no existe en el país ninguna forma farmacéutica que contenga como principio activo al ascaridol por lo que, uno de los fines del presente trabajo es ser el punto de inicio en el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento que contenga ascaridol, para lo cual es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar al principio activo, dentro de una formulación y forma farmacéutica determinada.

VI. RECOMENDACIONES

- Es importante tomar en cuenta que para validar un método analítico primero se debe tener un punto de partida denominado diseño experimental.
- La temperatura del horno, columna detector e inyector son factores a considerar cuando se trata de compuestos inestables o volátiles.
- El contenido de ascaridol en el *C. ambrosioides* es variable según el área de recolección, el tiempo y el suelo donde fue cultivado.

VII. ANEXOS

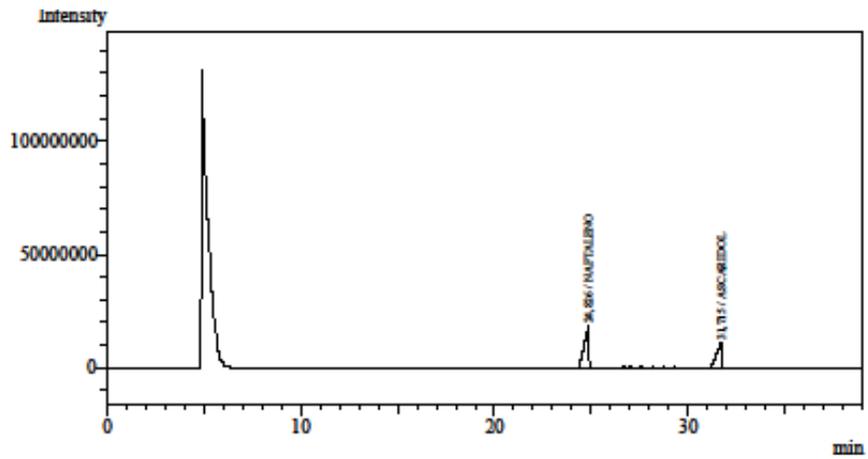
ANEXO 1. CROMATOGRAMA DE ASCARIDOL AL AMBIENTE



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area		
1	5.01	ETANOL	2646830205		
2	24.807	NAFTALENO	208136281		
3	31.412	ASCARIDOL	55120594		

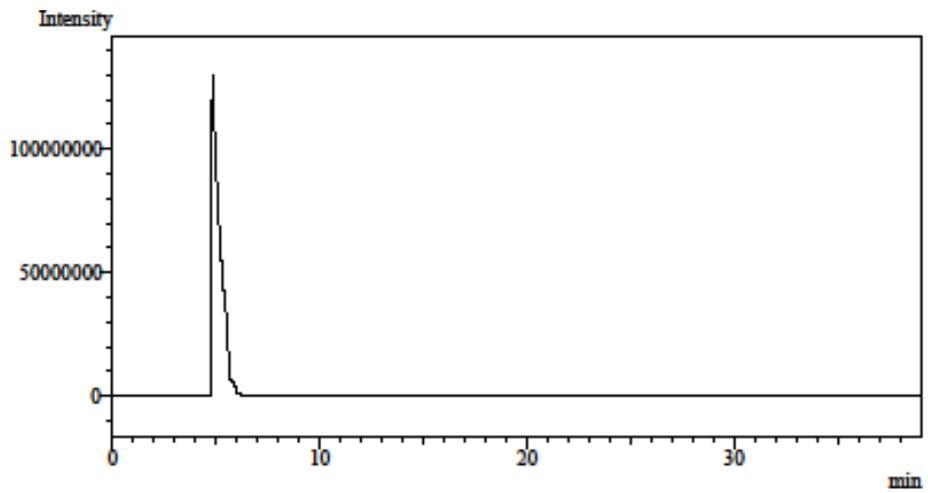
ANEXO 2. CROMATOGRAMA DE ASCARIDOL REFRIGERACION



Peak Table - Channel 1

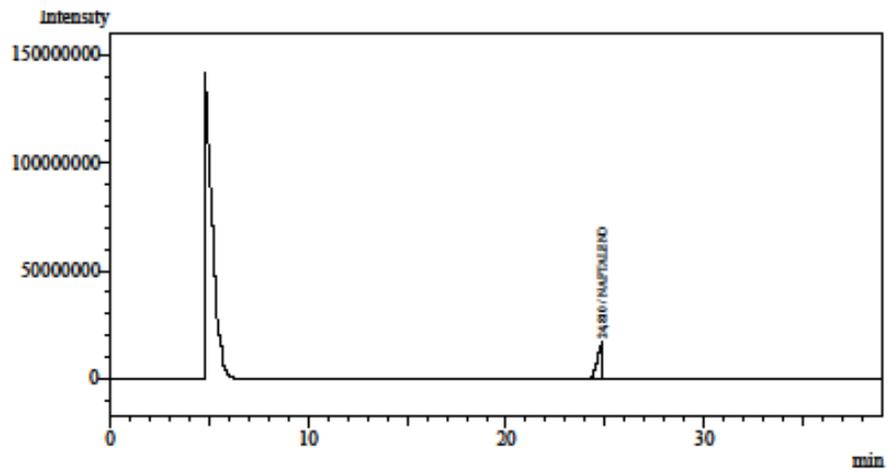
Peak#	Ret. Time	Name	Area
1	5.01	ETANOL	2646830205
2	24.826	NAFTALENO	310616736
3	31.715	ASCARIDOL	199841944

ANEXO 3. CROMATOGRAMA DEL SOLVENTE (ETANOL)



Peak Table - Channel 1

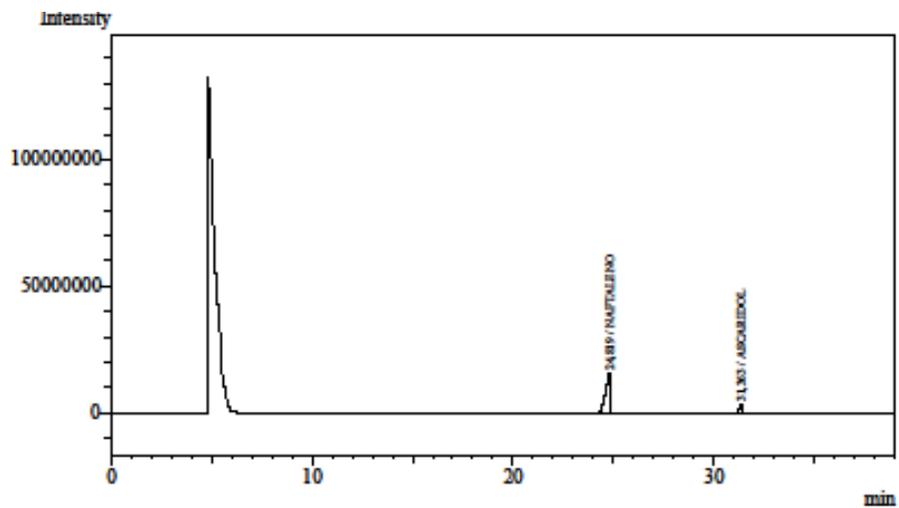
ANEXO 4. CROMATOGRAMA DEL SOLVENTE Y ESTANDAR INTERNO (NAFTALENO)



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret Time	Name	Area	Conc.	Units
1	5.01	ETANOL	2646830205		
2	24.810	NAFTALENO	259304120		

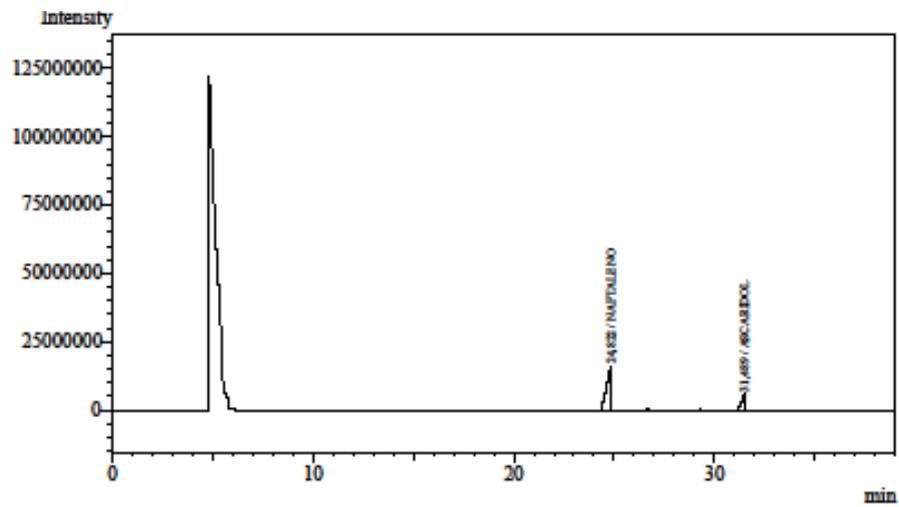
ANEXO 5. CROMATOGRAMA CONCENTRACION 5 mg/mL



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret Time	Name	Area	Conc.	Units
1	24.819	NAFTALENO	236262650	0,000	mg/mL
2	31.363	ASCARIDOL	23769580	4,970	mg/mL
Total			260032230		

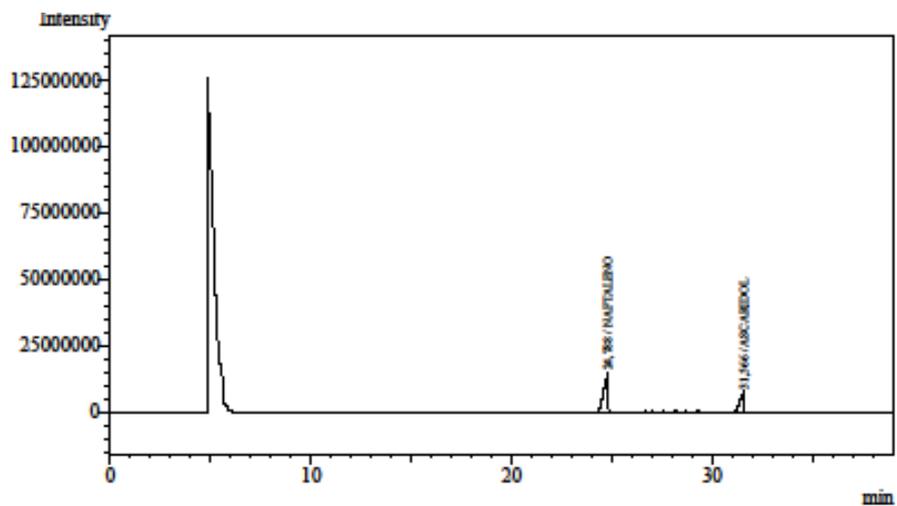
ANEXO 6. CROMATOGRAMA CONCENTRACION 12.5 mg/mL



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area	Conc.	Units
1	24.822	NAFTALENO	241237175	0.000	mg/mL
2	31.489	ASCARIDOL	65026665	12.429	mg/mL
Total			306263840		

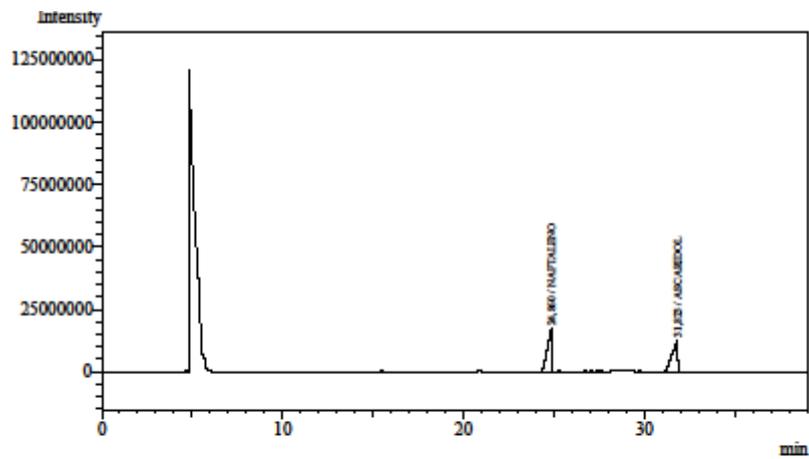
ANEXO 7. CROMATOGRAMA CONCENTRACION 25 mg/mL



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area	Conc.	Units
1	24.788	NAFTALENO	210840696	0.000	mg/mL
2	31.566	ASCARIDOL	100303418	24.404	mg/mL
Total			311144114		

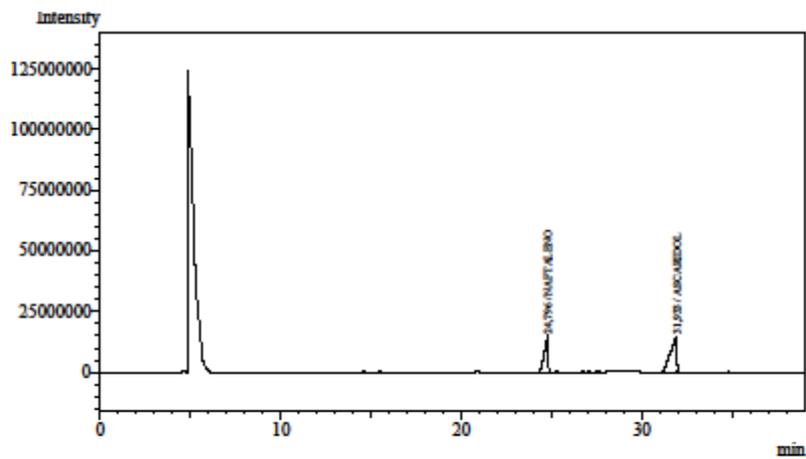
ANEXO 8. CROMATOGRAMA CONCENTRACION 50 mg/mL



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret Time	Name	Area	Conc.	Units
1	24.860	NAFTALENO	285652882	0.000	mg/mL
2	31.823	ASCARIDOL	267124511	49.408	mg/mL
Total			552777393		

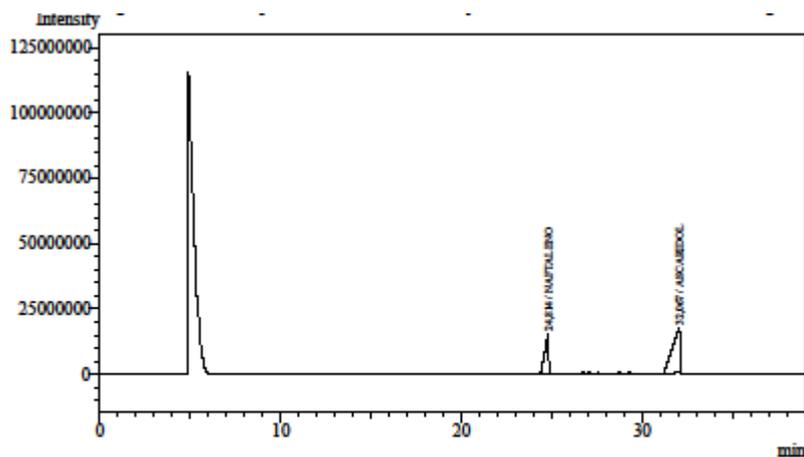
ANEXO 9. CROMATOGRAMA CONCENTRACION 75mg/mL



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret Time	Name	Area	Conc.	Units
1	24.796	NAFTALENO	218690275	0.000	mg/mL
2	31.933	ASCARIDOL	362776200	76.874	mg/mL
Total			581466475		

ANEXO 10. CROMATOGRAMA CONCENTRACION 100 mg/mL



Peak#	Ret. Time	Name	Area	Conc.	Units
1	24.814	NAFTALENO	233507009	0,000	mg/mL
2	32,067	ASCARIDOL	487857730	98,440	mg/mL
Total			721364739		

BIBLIOGRAFIA

1. **Jucafresa B.** 1995. *Guía de la Flora Medicinal, toxica, aromática y condimenticia*. Madrid : Aedos.
2. **OMS.** 2007. *Asamblea Mundial de la Salud*. s.l. : Resolucion WHA 58,27.
3. **De la Torre L. Navarrete H.** 2000. *Enciclopedia de las plantas*. Espana.
4. **Ríos M. Koziol M. Pedersen H. y Granda G (eds).** 2007. *Plantas Útiles del Ecuador*. Quito : Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Herbario AAU, Universidad de Aarhus, Dinamarca, The Exotic Blends Company.
5. **Cerón C.** 2008. *Plantas Medicinales de los mercados de Loja*. Quito : Escuela de Biología. Universidad Central.
6. www.herbotecnia.com.ar.
7. www.peruecologico.com.pe.
8. **Dembitsky V. et al.** 2008. *Ascaridole and Related Peroxides from the Genus Chenopodium*. Biomed Pad Med Fac Univ Palacky Olomouc , Vol. 152 (2):209-215, Czech Repub.

9. **Caferata L. Jeandupeux R. y Rimada R.** 2005. *Metodo Simple y Rapido para la Determinación de Ascaridol en Medio Acuoso Utilizando CLAE (RP-HPLC)*. Argentina : Acta Farm. Bonaerense . Vol. 24. 567:571.
10. **Torres A.M.** 2003. *Exámen del contenido de Ascaridol del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides L. (Paico)*. Argentina : Facena, 2003, Vol. 19. 27-32.
11. **Rahway N.J.** 1992. *The Merck Index*.: substance N 852 11va Edition.
12. **Gutierrez M.C. y Droguet M.** 2002. *La Cromatografía de Gases y la Espectrofotometría de masas: Identificación de Compuestos causantes de mal olor*. 122. Espana : Boletin Intexper U.P.C.
13. **Harris D.** 2003. *Análisis Químico Cuantitativo*. Reverte. Barcelona.
14. **Hernandez B. Castillo A. y Rolando G.** 1996. *Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos*. Revista cubana de farmacia. Vol. 30.
15. **Fernández A. Serret Y. Aguilera C. Morales I. Lacarrere y Alonso E.** 2002. *Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe*. Revista cubana de farmacia. Vol. 36.
16. **ICH.** 2005. *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human. Ich harmonised tripartite guideline validation of analytical procedure: text and methodology q2r1*.
17. **Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.** 2010. *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Nueva York.
18. **Guía de validación de metodos analíticos.** 2011. Asecal.
19. **Fauli i Trillo.** 1993. *Tratado de Farmacia Galénica*. Tratado F 2000. Madrid.
20. **OAA Organismo Argentino para Acreditacion.** 2003. *Guia para validación de métodos de ensayo*.
21. **Briceno V.** 2011. *Obtencion del extracto etanolico de la especie Chenopodium Ambrosoides (Paico)del Cantón Saraguro* . Loja : IQA- Fitoquímica.

