

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



**PROPUESTA DE GUÍA PARA EVALUAR LA
ESTABILIDAD QUÍMICA EN
PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS**

Ana Carolina Valdez Gomar

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, agosto de 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



**PROPUESTA DE GUÍA PARA EVALUAR LA
ESTABILIDAD QUÍMICA EN
PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS**

Trabajo de graduación presentado por
Ana Carolina Valdez Gomar

Para optar al grado de Maestra en Artes

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, agosto de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Velásquez Miranda	DECANO
M.A. Elsa Julieta Salazar de Ariza	SECRETARIA
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	VOCAL I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	VOCAL III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	VOCAL IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	VOCAL V

CONSEJO ACADÉMICO

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Rubén Velásquez Miranda, Ph.D.

María Ernestina Ardón Quezada, MSc.

Jorge Mario Gómez Castillo, MA.

Clara Aurora García González, MA.

José Estuardo López Coronado, MA.

RESUMEN

Los productos fitoterapéuticos son derivados de plantas y/o sus mezclas en forma de extractos, liofilizados, destilados, tinturas, cocimientos o cualquier preparación galénica que tienen utilidad terapéutica y una forma farmacéutica definida. Los anteriores productos, al igual que los medicamentos de síntesis deben de cumplir con estándares que aseguren su calidad.

La evaluación química de los productos fitoterapéuticos presenta varias dificultades cuando se compara con sustancias químicamente definidas, ya que las sustancias activas (drogas vegetales y/o preparaciones herbolarias) en dichos productos, consisten en una mezcla compleja de constituyentes, complicando la situación cuando dos o más drogas vegetales y/o preparaciones herbolarias se combinan en un solo producto.

En el presente trabajo, se hizo un análisis de las principales drogas vegetales y formas farmacéuticas de los productos fitoterapéuticos con registro sanitario en Guatemala, con el fin de proporcionar una guía para la evaluación de la estabilidad química de dichos productos.

La propuesta de guía para la evaluación de la estabilidad química de los productos fitoterapéuticos en Guatemala realizada, se basa en la cantidad de drogas vegetales que conforman cada producto, verificación de las metodologías analíticas existentes de las drogas vegetales que componen el preparado fitoterapéutico, extracción del metabolito secundario a analizar, realización y validación por cromatografía en capa fina del principal metabolito secundario del preparado fitoterapéutico y cuantificación del mismo a través del tiempo (0, 6, 12, 18 y 24 meses).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Fitoterapia	3
2.2 Características de la Fitoterapia	3
2.3 Control de Calidad de Productos Fitoterapéuticos	5
2.3.1 Evaluación Química	6
A. Métodos Analíticos	6
B. Cromatografía en Capa Fina	7
2.3.2 Evaluación Biológica	8
2.4 Estabilidad	8
2.4.1 Definición	8
2.4.2 Estudios de Estabilidad	8
2.4.3 Problemas Relacionados con la Estabilidad de los Productos Fitoterapéuticos	9
A. Inestabilidad Física	9
B. Condiciones Ambientales	9
C. Inestabilidad Química	9
D. Mezclas Complejas, Variabilidad e Inconsistencia	10
E. Interacciones, Deterioro, Descomposición y Almacenamiento	10
2.4.4 Recomendaciones para la Evaluación de la Estabilidad de Productos Fitoterapéuticos según la Agencia Europea de Medicina (EMA)	10
2.5 Reglamentación de Productos Fitoterapéuticos	12
2.5.1 Regulación vigente en Guatemala	12
2.5.2 Regulación en Colombia	12
2.6 Desarrollo de Nuevas Técnicas para el Estudio de la Estabilidad en Productos Fitoterapéuticos	13
2.7 Retos Económicos respecto a la Evaluación de la Estabilidad en Productos Fitoterapéuticos	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	17

4.1 Objetivo General	17
4.2 Objetivos Específicos	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Universo	18
5.2 Muestra	18
5.3 Medios	18
5.3.1 Recursos Materiales: Materiales & Equipo	18
5.4 Descripción de Actividades Realizadas	18
6. RESULTADOS	20
6.1 Principales plantas utilizadas en los preparados fitoterapéuticos, según registros vigentes al 18 marzo de 2013. Tabla 1	20
6.2 Principales formas farmacéuticas utilizadas en los preparados fitoterapéuticos, según registros vigentes al 18 marzo de 2013. Tabla 2	21
6.3 Propuesta de marcha analítica para evaluación de estabilidad química de productos fitoterapéuticos.	22
6.4 Equipo, materiales e insumos necesarios para llevar a cabo el análisis de metabolitos secundarios en los productos fitoterapéuticos, según las metodologías analíticas en capa fina propuestas	23
7. DISCUSIÓN	24
8. CONCLUSIONES	29
9. RECOMENDACIONES	30
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
11. ANEXOS	34
ANEXO 1: Cromatografías en capa fina de drogas vegetales contenidas en Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas, 2da ed. Wagner y Bladt. 2001	34
ANEXO 2: Cromatografías en capa fina de drogas vegetales contenidas en el sitio web de American Herbal Products Association (disponible en http://www.botanicalauthentication.org/index.php/category:botanical) revisado el 15 de octubre de 2015	40
ANEXO 3: Cromatografías en capa fina de drogas vegetales contenidas USP® Herbal Medicines Compendium (Disponible en http://hmc.usp.org/) revisado el 15 de octubre de 2015	47
ANEXO 4: Cuantificación de compuestos en cromatografía de capa fina	51
ANEXO 5: Cromatograma de Salviathymol ®	52

ANEXO 6: Ejemplo de selección de metabolito secundario para evaluación de huella cromatográfica en producto fitoterapéutico hipotético compuesto de varias drogas vegetales	53
ANEXO 7: Procedimientos de tamizaje fitoquímico por cromatografía en capa fina, según Procedimiento Estándar de Operación del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT	54

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas por el ser humano, sin embargo como consecuencia del progresivo avance de la química, la terapéutica moderna poco a poco consideró que podía prescindir de las especies vegetales. En las últimas décadas, se ha visto de nuevo un auge en el uso de los productos fitoterapéuticos, debido a varias razones: efectos secundarios de los medicamentos de síntesis, aparición de enfermedades crónicas propiciadas por el aumento de la esperanza de vida que requieren un tratamiento continuo menos agresivo, enfermedades o síntomas que no siempre justifican el empleo de medicamentos agresivos, menor costo económico, prevención de enfermedades y finalmente un sentido de vuelta a lo natural.

La fitoterapia, es la medicina basada en el uso de las plantas medicinales, mediante los medicamentos fitoterapéuticos. Los anteriores están constituidos por ingredientes activos de origen vegetal formulados bajo la forma farmacéutica más adecuada para su administración. La utilización de la fitoterapia en las prácticas terapéuticas, con sustento científico, exige acciones multisectoriales que involucren desde la producción primaria de plantas medicinales hasta el establecimiento de los procesos de control de calidad de las materias primas y medicamentos.

Los productos fitoterapéuticos, al igual que los medicamentos de síntesis, deben de cumplir con estándares que aseguren su calidad; sin embargo las sustancias activas en los primeros, debido a que son una mezcla compleja de constituyentes, hace más difícil la evaluación de la calidad.

El presente trabajo tuvo como propósito establecer guías para la evaluación de la calidad de los productos fitoterapéuticos, específicamente la estabilidad química de los mismos; es decir, la aptitud del producto fitoterapéutico, de mantener en el tiempo sus características originales dentro de las especificaciones establecidas. Lo cual se logró, mediante la identificación de las principales drogas vegetales utilizadas en la elaboración de productos

fitoterapéuticos en Guatemala, luego se estableció, mediante la revisión de literatura científica, una propuesta de guía para la evaluación de la estabilidad química, de forma confiable, reproducible, sencilla y con un costo relativamente bajo.

La verificación de la estabilidad química de los productos fitoterapéuticos a través del tiempo es importante para varios sectores: sector regulatorio, que es el encargado de velar por la calidad de los productos fitoterapéuticos; sector privado, ya que los productos fitoterapéuticos producidos, tendrán un valor agregado al demostrar la calidad de sus productos a través del tiempo y, finalmente para el público consumidor, el cual estará tomando productos fitoterapéuticos con las concentraciones adecuadas de metabolitos secundarios, encargados de la acción terapéutica establecida.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fitoterapia

La **fitoterapia** es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. (Avello y Cisternas, 2010); (Barnes, Anderson y Phillipson, 2007); (Cáceres, 2003).

La palabra fitoterapia procede del griego y está formada por *fitos* (=planta) y *terapeia* (=curación).

Según la Organización Mundial de Salud (OMS), una **planta medicinal** es aquella que, en uno o más de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica.

La Organización Mundial de Salud (OMS), define **droga** como la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica. La Real Farmacopea Española establece que: “*se consideran drogas vegetales las plantas, partes de plantas, algas, hongos o líquenes, enteros, fragmentados o cortados, sin procesar, generalmente desecados, aunque también a veces en estado fresco. También se consideran drogas vegetales ciertos exudados que no han sido sometidos a un tratamiento específico*”.

Los **principios activos** son las sustancias responsables de la acción farmacológica.

Los **medicamentos a base de plantas, medicamentos fitoterapéuticos o productos fitoterapéuticos** son medicamentos cuyos principios activos son exclusivamente de origen vegetal y/o preparados de drogas vegetales.

2.2 Características de la Fitoterapia

A diferencia de la medicina sintética o convencional, la fitoterapia utiliza matrices vegetales complejas. Estas matrices las constituyen plantas enteras, partes de ellas (hojas, raíces, etc.), y también productos de éstas, resultados de tratamientos directos con algún disolvente o medio que concentre los compuestos afines y facilite su administración, son los llamados extractos. En cualquier caso en esta matriz compleja nos encontramos con un sin número de compuestos de diferente naturaleza química, a esta mezcla se la llama fitocomplejo. (Avello y Cisternas, 2010).

El **fitocomplejo** es la mezcla de sustancias activas y otras acompañantes que actúan en conjunto para lograr un mismo fin terapéutico, que no sería el mismo si se administraran por separado, o sea como monosustancias.

Estas sustancias activas son llamadas técnicamente **metabolitos secundarios** y se refieren a las sustancias que son el producto secundario de la fotosíntesis y que intervienen en procesos vegetales como la defensa frente a patógenos, y protección a los rayos ultravioleta (UV), entre otros. La mezcla de metabolitos secundarios son únicos para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por la genética vegetal, pero también influyen la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores.

Los metabolitos secundarios corresponden a compuestos que dependiendo de la orden genética pueden ser biosintetizados siguiendo diversas rutas metabólicas, así podemos encontrar compuestos de la familia fenólica como los flavonoides; terpénica como las saponinas y aceites esenciales; alcaloides; esteroidea como los cardiotónicos y fitohormonas, y polímeros heterogéneos como las gomas y mucílagos. (Avello y Cisternas, 2010).

Durante la década pasada, hubo un aumento en la aceptación y el interés del público en las terapias naturales, en ambos, países en vías de desarrollo y países desarrollados. Debido a la pobreza y el acceso limitado a los medicamentos de síntesis, cerca de cuatro billones de personas, 80% de la población mundial, que viven en países en vías de desarrollo utilizan la medicina herbolaria como su fuente primaria de cuidado de salud. En estas comunidades, la medicina tradicional es parte integral de su cultura.

En las culturas occidentales, las personas están atraídas hacia los fitoterapéuticos por varias razones, la más importante es que, al igual que sus antecesores, creen que los productos naturales les ayudarán a vivir vidas más saludables. Las medicinas herbolarias son generalmente vistas como alternativas balanceadas y moderadas para el proceso de curación. Las personas que utilizan los productos fitoterapéuticos gastan billones de dólares en estos productos, como tales estos representan una proporción sustancial del mercado mundial de medicamentos.

El resurgimiento en el interés de las plantas medicinales y productos fitoterapéuticos se ha debido a varios factores:

- La efectividad de las plantas medicinales
- La preferencia de los consumidores por las terapias naturales
- Mayor interés en las medicinas alternativas
- Alto costo y efectos secundarios de medicamento de síntesis.
- Mejoras en la calidad, eficacia y seguridad de los productos fitoterapéuticos con el desarrollo de la ciencia y la tecnología. (Bandaranayake, 2006).

2.3 Control de Calidad de Productos Fitoterapéuticos

El control de calidad de los productos fitoterapéuticos es esencial y puede definirse como el estado de la droga vegetal, el cual es determinado por su identidad, pureza, contenido y otras características químicas, físicas o biológicas, o por su proceso de manufactura. Comparado con los fármacos de síntesis, los criterios y el enfoque de los productos fitoterapéuticos son mucho más complejos. (Ahmad, Aqil y Owais, 2006).

Varios factores, los cuales no aplican a los fármacos de síntesis, influyen la calidad de los productos fitoterapéuticos:

- Las drogas vegetales son generalmente mezclas de varios constituyentes.
- El(los) principio(s) activo(s) es (son), en muchos casos desconocidos.
- Métodos analíticos selectivos o compuestos de referencia no están disponibles comercialmente.
- Las drogas vegetales son química y naturalmente variables.
- Existencia de quimio-variedades y quimio cultivares.
- La variabilidad en el origen y calidad de las plantas medicinales.
- Los efectos de los métodos de cosecha, secado, almacenamiento, transporte y procesamiento (e.g. método de extracción y polaridad del solvente extractor, inestabilidad de los constituyentes, etc.) (Bandaranayake, 2006).

En general, el control de calidad se basa en tres definiciones farmacopeicas importantes:

- **Identidad:** ¿es la planta medicinal que deseamos utilizar?
- **Pureza:** ¿hay contaminantes presentes?
- **Contenido o ensayo:** ¿el contenido de los componentes activos está dentro de los límites definidos?

Resulta obvio que el contenido de los componentes activos es uno de los parámetros más difíciles de evaluar, ya que en la mayoría de drogas vegetales los componentes activos son desconocidos. Algunas veces se utilizan **marcadores** los cuales son, por definición, constituyentes químicamente definidos que tienen interés para fines de control de calidad, independientemente si tienen o no una acción terapéutica. (Ahmad et al., 2006).

Hay dos tipos de marcadores:

- **Marcadores Activos:** son los compuestos o grupos de compuestos que contribuyen a la actividad terapéutica.
- **Marcador Analítico:** son los compuestos o grupos de compuestos que sirven para fines analíticos.

(Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2010).

2.3.1 Evaluación Química

La mayor parte de las drogas vegetales poseen componentes químicos definidos a los cuales se les atribuye su actividad farmacológica o biológica. Un tamizaje fitoquímico preliminar es parte de esta evaluación química, el cual es útil en la identificación de compuestos químicos y detección de adulteración. (Kamboj, 2012).

A. Métodos Analíticos

Las monografías publicadas en las distintas farmacopeas son el enfoque más práctico para el control de calidad de las drogas vegetales. Cuando no hay monografías farmacopeicas disponibles, el desarrollo y validación de procedimientos analíticos se deben de llevar a cabo. La mejor estrategia, es el seguir cuidadosamente las definiciones farmacopeicas de identidad, pureza y contenido o ensayo. Fuentes valiosas para procedimientos analíticos generales se incluyen en las farmacopeas, así como en guías publicadas por la OMS. Información adicional, especialmente en métodos cromatográficos y/o espectroscópicos se puede encontrar en literatura científica general. La droga vegetal o extracto puede ser evaluado por varios métodos para determinar su actividad farmacológica, potencia y toxicidad. Una técnica cromatográfica muy simple, como lo es la cromatografía en capa fina (CCF) puede proveer información valiosa para establecer la identidad de la droga vegetal. Esto es especialmente importante para aquellas especies que contengan distintos compuestos activos. Información cualitativa y cuantitativa puede ser reunida respecto a la presencia o ausencia de metabolitos secundarios o productos de degradación.

La huella por CCF es de vital importancia para las drogas vegetales que contienen aceites esenciales, resinas y gomas, las cuales son mezclas complejas de constituyentes y no poseen ninguna estructura orgánica. Es una herramienta poderosa y una solución relativamente rápida para distinguir entre clases químicas, donde la macroscopia y la microscopia fallan. Los cromatogramas de los aceites esenciales, por ejemplo, son ampliamente publicados en la literatura científica, y pueden ser de invaluable ayuda en identificación y/o cuantificación.

Los instrumentos para la determinación espectrofotométrica ultravioleta-visible (UV/VIS) son fáciles de operar, y sus procedimientos de validación son sencillos pero al mismo tiempo precisos. Aunque las mediciones son rápidas, la preparación de la muestra puede consumir tiempo y trabaja bien solo para muestras poco complejas, y para aquellos compuestos que absorben en la región UV/VIS.

El método preferido para el análisis cuantitativo de mezclas más complejas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Aunque la separación de compuestos volátiles como aceites esenciales y ácidos grasos se puede lograr mediante HPLC, se prefiere la cromatografía de gases (CG) o cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (CG/SM). Las técnicas de CCF, HPLC, CG, CCF cuantitativa (CCFC), CCF de alta resolución (HPTLC) pueden determinar la homogeneidad de una droga vegetal o un extracto vegetal. Basados en el concepto de fotoequivalencia, las huellas cromatográficas de los productos fitoterapéuticos, pueden ser utilizadas para referirse al tema de control de calidad. . (Kamboj, 2012).

B. Cromatografía en Capa Fina

La CCF es el método más común y versátil para el análisis de las drogas vegetales y productos fitoterapéuticos. Varias farmacopeas, Farmacopea Herbolaria India, Farmacopea Ayurvédica, Farmacopea Americana Herbolaria (AHP), Monografías de Drogas Vegetales Chinas, Farmacopea de la República de China, entre otras, utilizan la CCF como método analítico.

La CCF tiene múltiples posibilidades en la detección y análisis de los productos fitoterapéuticos, además de ser simple y poder realizar varios análisis al mismo tiempo. La HPTLC permite la obtención de CCF flexibles, confiables y costo-efectivas. Con los métodos de CCF cualitativa (TLCQA-UV) es posible la obtención de información

cualitativa y cuantitativa de placas de CCF desarrolladas. Las ventajas en la utilización de CCF para la construcción de huellas cromatográficas son su simplicidad, versatilidad, velocidad de análisis, sensibilidad específica y simple preparación de la muestra. Por lo anterior la CCF es un método conveniente para determinar la calidad y posible adulteración de productos fitoterapéuticos. (Kamboj, 2012).

2.3.2 Evaluación Biológica

Las drogas vegetales poseen actividades biológicas y farmacológicas específicas las cuales son utilizadas para su evaluación. Esta actividad es debida a componentes específicos presentes en la droga vegetal y/o extracto. Para la evaluación de la actividad biológica se utilizan ambos órganos intactos y aislados de animales. Con la ayuda de los bioensayos, la potencia de la droga vegetal también puede ser evaluada. (Kamboj, 2012). Entre las actividades biológicas más importantes se pueden mencionar las siguientes:

- Actividad antibiótica,
- Actividad antifertilidad,
- Actividad hipoglucemiante,
- Actividad neurofarmacológica

2.4 Estabilidad

2.4.1 Definición

Aptitud del producto fitoterapéutico, de mantener en el tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones establecidas, en relación a su identidad, calidad, pureza y apariencia física.

2.4.2 Estudios de Estabilidad

La determinación de la estabilidad de una droga vegetal en una formulación fitoterápica es importante. El objetivo de la estabilidad es asegurar que la droga vegetal/producto fitoterápico se mantengan dentro de las especificaciones establecidas que aseguran su identidad, calidad y pureza. Puede ser interpretado como el periodo de tiempo bajo condiciones específicas y almacenamiento en el cual un producto permanecerá dentro de los límites predefinidos para todas sus características importantes. Cada componente, ya sea terapéuticamente activo o no, en una forma fitoterapéutica puede afectar la estabilidad del mismo. Factores ambientales como la temperatura, luz, aire (específicamente oxígeno, dióxido de

carbono y vapor de agua) y humedad pueden afectar la estabilidad. Similarmente, los factores como el tamaño de partícula, pH, las propiedades de los solventes empleados, la naturaleza del envase y la presencia de otros compuestos resultado de la contaminación o de la mezcla intencional con otros productos pueden influenciar la estabilidad. (Thakur, Ghodasra, Patel, y Dabhi, 2011).

2.4.3 Problemas Relacionados con la Estabilidad de los Productos Fitoterapéuticos

A. Inestabilidad Física

Los productos fitoterapéuticos pueden sufrir inestabilidad física debido a la presencia de impurezas y reacciones con el envase. Condiciones como el crecimiento de microorganismos pueden afectar los metabolitos secundarios y la composición química del producto. Los compuestos activos volátiles de los productos fitoterapéuticos poseen el problema de la volatilidad y disminuyen su actividad durante un almacenamiento muy prolongado. (Thakur et al., 2011).

B. Condiciones Ambientales

Las condiciones ambientales como lluvia, altitud, temperatura, suelos, condiciones de almacenamiento, así como distintos tipos de cosecha, tiempo y época de colecta, procesos de manufactura: selección, secado, purificación, extracción y variabilidad genética pueden crear una variabilidad sustancial en la calidad del producto, su estabilidad y la concentración de metabolitos secundarios entre distintos productos. La luz es un factor prominente que afecta las fitoformulaciones al generar radicales libres. (Thakur et al., 2011).

C. Inestabilidad Química

Los productos fitoterapéuticos generalmente sufren degradación durante su almacenamiento por oxidación, hidrólisis, cristalización, ruptura de emulsión, deterioro enzimático y reacciones químicas con los aditivos y excipientes. La temperatura y humedad son los dos principales factores que afectan la estabilidad de dichos productos. Las reacciones químicas de degradación aumentan en un factor de dos a tres veces por cada aumento de

10°C. La humedad absorbida en la superficie de una droga sólida, generalmente aumenta la tasa de descomposición si es susceptible a hidrólisis. La presencia de enzimas en el producto también incrementa la tasa de degradación química. (Thakur et al., 2011).

D. Mezclas Complejas, Variabilidad e Inconsistencia

Los productos fitoterapéuticos con mezclas complejas de diferentes componentes obtenidos durante procesos de extracción. Cada componente tiene una vida de anaquel, actividad, concentración y consistencia característicos. Lo anterior causa un problema durante el almacenamiento, ya que no es fácil determinar la estabilidad final de un producto fitoterápico basado en el perfil de estabilidad y actividad de un solo componente. (Thakur et al., 2011).

E. Interacciones, Deterioro, Descomposición y Almacenamiento

La humedad por sobre el valor crítico y el crecimiento de mohos en los productos fitoterapéuticos puede causar la interacción de sus componentes activos con el material de empaque. También, las interacciones de los compuestos activos con otros ingredientes en la formulación, como los aditivos pueden causar alteraciones en la actividad del producto fitoterápico. Las formulaciones fitoterapéuticas poseen muchos componentes como alcaloides, glucósidos, taninos, flavonoides, entre otros, y cada componente posee diferentes condiciones de estabilidad, por lo que, las condiciones de estabilidad para el producto fitoterapéutico es diferente a las de sus componentes individuales. (Thakur et al., 2011).

2.4.4 Recomendaciones para la Evaluación de la Estabilidad de Productos Fitoterapéuticos según la Agencia Europea de Medicina (EMA)

Tomando en cuenta la naturaleza específica y compleja de los productos fitoterapéuticos, sus marcadores pueden proveer una opción para asegurar y demostrar la calidad de estos productos. Sin embargo, debido a la limitada guía que existe en este campo en particular, los siguientes principios se deben de tomar en cuenta:

- La selección de los marcadores debe ser justificada.

- Los marcadores deben ser apropiados para su uso (e.g. identificación, cuantificación, control analítico, estabilidad)
- Los marcadores deben conectar pasos del proceso de producción y medidas de control de calidad.
- Los marcadores deben ser utilizados tanto para fines cuantitativos como cualitativos. Los marcadores propuestos deben proveer una herramienta importante para relacionar la(s) sustancia(s) activa(s) y/o preparación(es) herbolarias, al producto fitoterápico independientemente si tiene o no una actividad terapéutica. En general, el(los) mismo(s) marcador(es) es(son) utilizado(s) para el producto fitoterápico al término de su vida en anaquel. Las excepciones deben de ser justificadas.
- Los límites de aceptación del contenido de un marcador propuesto deben ser especificado y justificado.
- Como la droga vegetal o preparado fitoterápico es considerado como una sustancia activa, una mera determinación de la estabilidad de un marcador no será suficiente. La estabilidad de otras sustancias presentes en la droga vegetal o el preparado fitoterápico, debe, tanto como sea posible, demostrarse (e.g. por medio de huellas cromatográficas apropiadas). También debe de ser demostrado que el contenido permanece comparable a la huella inicial. (Kruse y Sultan, 2010).

Para un análisis cuantitativo, los siguientes pasos deben de ser considerados:

- Si compuestos con actividad terapéutica conocida están presentes, su contenido necesita ser determinado cuantitativamente.
- Si no hay compuestos responsables de una actividad terapéutica conocida, pero si un marcador activo conocido, este marcador activo debe de ser seleccionado para el análisis cuantitativo, a menos se justifique de otra manera.
- Si la selección de compuestos responsables de una actividad terapéutica o un marcador activo no es posible para un análisis cuantitativo, un marcador analítico debe de ser seleccionado teniendo en cuenta los siguientes principios:
 - a. Se debe priorizar el que el marcador seleccionado permita un ensayo específico de la sustancia activa.

- b. El marcador debe servir para calcular la cantidad de la sustancia activa (droga vegetal o preparado herbolario, respectivamente) en el producto terminado (producto fitoterapéutico)
- c. La selección de los marcadores para el análisis cuantitativo permite el análisis cuantitativo de cada sustancia activa en el producto fitoterapéutico terminado.
 - En el caso de combinación de productos, si no es posible la selección de un marcador separado para cada sustancia activa, un análisis conjunto debe de llevarse a cabo, si se justifica adecuadamente.
 - Un marcador adecuado es una sustancia o conjunto de sustancias.

Para el análisis cualitativo, los siguientes pasos deben de ser considerados:

- La selección del marcador utilizado para la identificación debe de ser justificado.
- Un marcador adecuado es una sustancia o grupo de sustancias.

Para las drogas vegetales y sus preparaciones, la evaluación de estabilidad en condiciones aceleradas o intermedias debe de ser omitida. Lo anterior debe aplicar también a los productos terminados, ya que es conocido que la mayoría de estos productos se degradan a 30°C/65 por ciento de humedad relativa (HR) y a 40°/75%HR en particular. (Kruse y Sultan, 2010).

2.5 Reglamentación de Productos Fitoterapéuticos

2.5.1 Regulación vigente en Guatemala

En el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA.11.03.56:09, Productos Farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales para Uso Humano. Verificación de la Calidad. Anexo 1 de la Resolución No. 270-2011 (COMIECO-LX), no se especifica ningún parámetro respecto a la evaluación de la estabilidad de los Productos Naturales, solamente se especifican pruebas físicas, químicas y microbiológicas.

2.5.2 Regulación en Colombia

El documento Regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos, del Ministerio de la Protección Social Colombia, especifica:

“... a los productos fitoterapéuticos objeto del presente decreto no se les otorgará una vida útil superior a dos (2) años, salvo que se alleguen los estudios de estabilidad de envejecimiento natural que sustenten una vida útil superior a la aquí establecida. En todo caso no se aprobará una vida útil superior a cuatro (4) años...”

Regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos. Ministerio de la Protección Social Colombia § 2266 (2004).

2.6 Desarrollo de Nuevas Técnicas para el Estudio de la Estabilidad en Productos Fitoterapéuticos

Se debe tener en cuenta técnicas alternativas que determinen cualitativamente la estabilidad y reduzcan significativamente los costos como:

- Desarrollo de técnicas cromatográficas que disminuyan dramáticamente el requerimiento de información de estabilidad como un requerimiento de pre-autorización para comercializar en el mercado. Dicho sistema ha sido evaluado en Australia y es supervisado por el regulador de medicamentos, la Administración de Bienes Terapéuticos (TGA, por sus siglas en inglés). Dichos sistemas involucran el desarrollo de sistemas apropiados para productos específicos.
- Métodos quimiométricos para el análisis de huellas cromatográficas, utilizando los compuestos de Fisher.
- Resonancia de Superficie de Plasmon
- Ensayos biológicos: en lugar de la evaluación de los compuestos activos o marcadores, los ensayos que evalúan la actividad biológica pueden ser apropiados, como por ejemplo:
 - Actividad antioxidante: ensayos que evalúan la actividad de las especies reactivas al oxígeno, utilizando peroxinitrito, radicales hidroxilo o superóxido dismutasa.
 - Ensayos para la actividad contra citoquinas inflamatorias (e.g. TNF) y adhesión de moléculas (e.g. integrinas, inmunoglobulinas)
 - Actividad antimicrobiana: contra mohos, levaduras, bacterias y protozoos.
 - Actividad contra otros microorganismos. (ANH, 2009).

2.7 Retos Económicos Respecto a la Evaluación de la Estabilidad en Productos Fitoterapéuticos

El costo de un equipo de HPLC es aproximadamente de € 60,000. El costo de los procedimientos debe de incluir el desarrollo de las técnicas para demostrar los marcadores químicos de cada producto fitoterapéutico (con una o varias drogas vegetales). Lo anterior resulta oneroso en términos del tiempo y el personal involucrado, estando por encima de la capacidad de las pequeñas y medianas empresas en el sector.

El costo de los gabinetes capaces de almacenar 20-30 muestras de productos por 3 años, tiene un costo aproximado de € 10,000 - € 15,000. Sin embargo, el mantenimiento y funcionamiento del mismo es costoso. El Foro Herbal en el Reino Unido, ha calculado recientemente que el costo del estudio de estabilidad en la región es de £ 11,000 (€12,333) por producto, mientras un producto que posee una combinación de cuatro drogas vegetales en la región (europea) costará cerca de £ 31,000 (€34,760). (ANH Consultancy Ltd., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La evaluación de los productos fitoterapéuticos presenta varias dificultades cuando se compara con sustancias químicamente definidas, en particular:

- Las sustancias activas (drogas vegetales y/o preparaciones herbolarias) en las preparaciones fitoterapéuticas, consisten en una mezcla compleja de constituyentes y, en la mayoría de los casos, los constituyentes responsables de la propiedad terapéutica son desconocidos
- La situación se complica cuando dos o más drogas vegetales y/o preparaciones herbolarias se combinan en un producto fitoterapéutico.
- En muchos casos las drogas vegetales y/o extractos presentes en los productos fitoterapéuticos, poseen constituyentes similares, dando lugar a más dificultades analíticas.

Los productos fitoterapéuticos, poseen un conjunto de características que claramente los diferencian de fármacos de síntesis, por lo tanto se necesitan guías de estabilidad específicas: versátiles, según la droga vegetal contenida, confiables y económicas en su aplicación.

A pesar de la complejidad de los productos fitoterapéuticos, los métodos para evaluar su estabilidad deben ser precisos, confiables, sencillos y relativamente baratos, para asegurar la aplicabilidad de los mismos en las pequeñas y medianas industrias que fabrican productos fitoterapéuticos.

La importancia de la presente propuesta de guía trasciende a varios sectores:

- **Sector regulatorio (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social)**, contaría con una guía para la evaluación de productos fitoterapéuticos y por lo tanto podría evaluar la calidad de los medicamentos fitoterapéuticos, garantizando así la calidad de los mismos.
- **Sector empresarial**, al contar con una guía para la evaluación de los productos fitoterapéuticos que producen, estos tendrán un valor agregado ya que podrán demostrar la calidad de los mismos a través del tiempo; además, podrán ser

competitivos a nivel internacional ya que se están cumpliendo los parámetros de calidad que exigen entes reguladores como lo es la Agencia Europea de Medicinas (EMA, por sus siglas en inglés European Medicines Agency).

- **Consumidores de Productos Fitoterapéuticos**, al garantizar que la calidad de los productos fitoterapéuticos se mantiene a través de tiempo, se asegura que el tratamiento será eficaz, seguro y confiable.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Establecer una propuesta de guía para evaluar la estabilidad química de los productos fitoterapéuticos en Guatemala.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar las drogas vegetales mayormente utilizadas en productos fitoterapéuticos con registro sanitario en Guatemala.
- Determinar las formas farmacéuticas de los productos fitoterapéuticos.
- Establecer una marcha analítica para la evaluación de los productos fitoterapéuticos.
- Definir equipo, materiales e insumos necesarios para llevar a cabo el análisis de metabolitos secundarios en los productos fitoterapéuticos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Universo

Productos fitoterapéuticos con registro sanitario vigente en Guatemala.

5.2 Muestra

Productos fitoterapéuticos que contienen las drogas vegetales mayormente utilizadas.

5.3 Medios

5.3.1 Recursos Materiales: Materiales & Equipo

- Papel
- Lápiz
- Computadora
- Software para análisis y tabulación de datos
- Software procesador de datos
- Sitio web del Ministerio de Salud Pública de Guatemala

5.4 Descripción de actividades realizadas

1. Revisión del listado de productos fitoterapéuticos con registro sanitario en Guatemala, en la página del Ministerio de Salud Pública de Guatemala, <http://www.medicamentos.com.gt/index.php/consultas/registros-vigentes>, para determinar las principales drogas vegetales utilizadas así como la forma farmacéutica en la que se encuentran.
2. Revisión de las metodologías analíticas en la literatura científica para la evaluación de drogas vegetales utilizando cromatografía en capa fina, para el establecimiento de una marcha analítica para la evaluación de la estabilidad de los productos fitoterapéuticos. (Wagner, H., Bladt, S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd ed, Berlin: Springer; Herbal Medicines Compendium. (2013). United States Pharmacopeial Convention: Recuperado de <https://hmc.usp.org/>)

3. Descripción del equipo, materiales e insumos necesarios para llevar a cabo el análisis de metabolitos secundarios en los productos fitoterapéuticos, según las metodologías analíticas en capa fina propuestas.
4. Elaboración de la Propuesta de Guía para la Evaluación de la Estabilidad Química de Productos Fitoterapéuticos, tomando en cuenta las drogas vegetales mayormente utilizadas en los productos fitoterapéuticos en Guatemala.

6. RESULTADOS

6.1 Principales plantas utilizadas en los preparados fitoterapéuticos, según registros vigentes al 18 marzo de 2013.

Tabla 1

Nombre Común	Nombre Científico	Cantidad de preparados en las que se utiliza
Pasiflora	<i>Passiflora incarnata</i>	52
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i>	
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	42
Tilo	<i>Tilia sp.</i>	40
Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	39
Menta	<i>Mentha piperita</i>	32
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i>	29
Maca	<i>Lepidium meyenii; L. peruvianum</i>	27
Uña de gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	
Equinacea	<i>Echinacea purpurea</i>	25
Saw palmetto	<i>Serenoa repens</i>	
Boldo	<i>Peumos boldus</i>	24
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i>	
Naranja	<i>Citrus aurantium</i>	
Ortiga	<i>Urtica dioica</i>	
Damiana	<i>Turnera difussa</i>	22
Fenogreco	<i>Trigonella foenum graecum</i>	
Amargón	<i>Taraxacum officinale</i>	19
Lúpulo	<i>Humulus lupulus</i>	
Psyllium	<i>Plantago ovata</i>	
Zarzaparrilla	<i>Smilax sp</i>	17
Zarzaparrilla	<i>Smilax aspera</i>	
Aloe vera	<i>Aloe vera</i>	16
Hiedra	<i>Hedera hélix</i>	
Cúrcuma	<i>Curcuma longa</i>	14
Jengibre	<i>Zingiber officinale</i>	
Melissa	<i>melissa officinalis</i>	
Ajo	<i>Allium sativum</i>	13
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	
Bolsa de pastor	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	12
Aloe	<i>Aloe vera</i>	11
Anís	<i>Pimpinela anisum</i>	
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i>	
Ruibarbo	<i>Rheum officinale, R. palmatum</i>	
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	

Nombre Común	Nombre Científico	Cantidad de preparados en las que se utiliza
Cascara sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	10
Ginseng siberiano	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	
Sen	<i>Cassia</i> sp.	

Fuente: Listado de registros vigentes al 18 de marzo de 2013, publicado en el por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, www.medicamentos.com.gt.

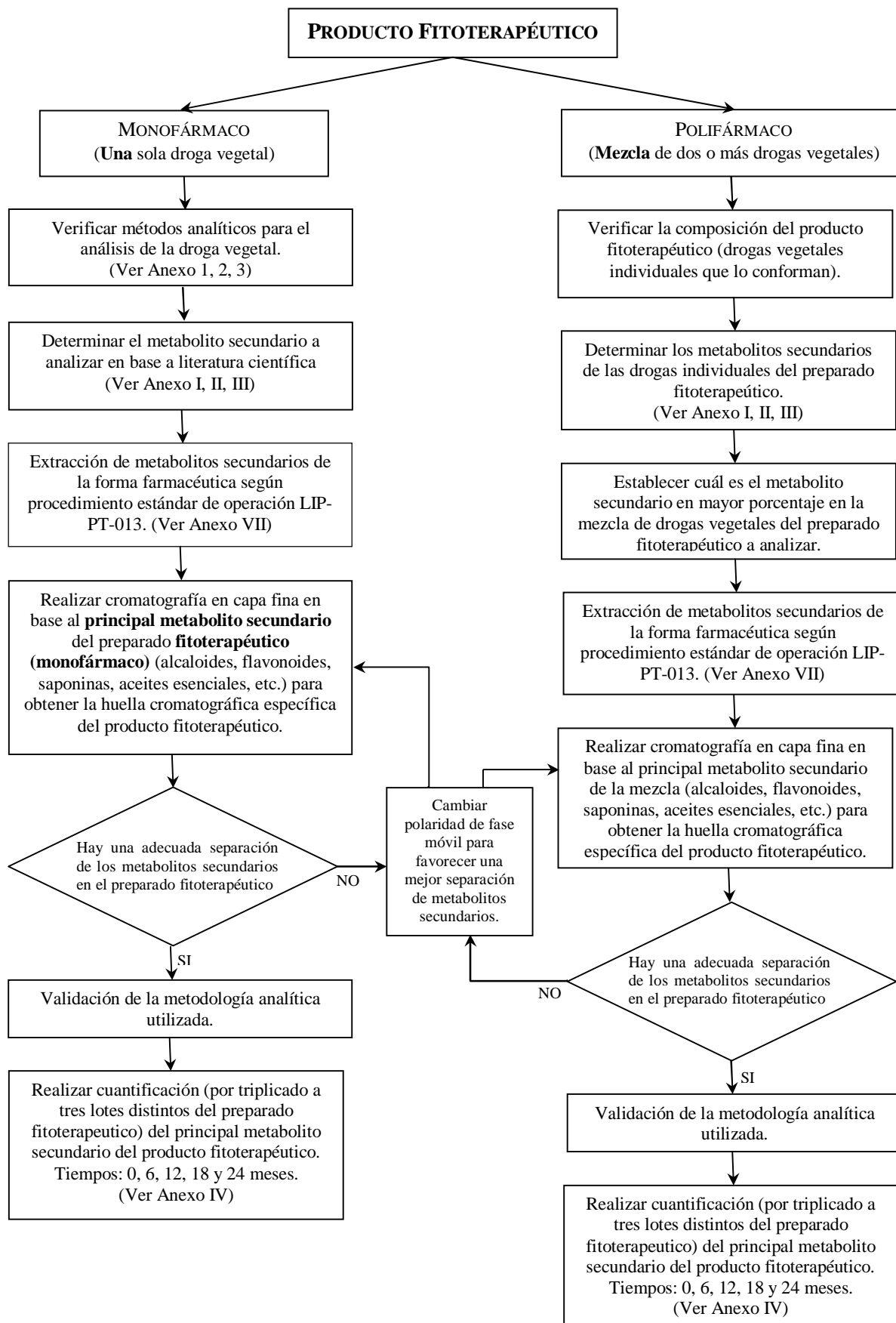
6.2 Principales formas farmacéuticas utilizadas en los preparados fitoterapéuticos, según registros vigentes al 18 marzo de 2013

Tabla 2

Forma farmacéutica	Cantidad
Cápsulas	202
Solución oral	89
Jarabe	78
Capsulas de gelatina blanda	55
Tintura oral	28
Plantas en polvo para infusión	17
Polvo para suspensión oral	12
Elixir	9
Crema tópica	7
Gel tópico	6
Pomada tópica	5
Tabletas recubiertas	4
Tintura	4
Aceite	3
Suspensión oral	3
Tintura oral y tópica	3

Fuente: Listado de registros vigentes al 18 de marzo de 2013, publicado en el por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, www.medicamentos.com.gt

6.3 Propuesta de marcha analítica para evaluación de estabilidad química de productos fitoterapéuticos.



6.4 Equipo, materiales e insumos necesarios para llevar a cabo el análisis de metabolitos secundarios en los productos fitoterapéuticos, según las metodologías analíticas en capa fina propuestas.

- Reactivos específicos para cada metabolito.
- Disolventes orgánicos según el ensayo.
- Ácidos y bases según el caso.
- Cristalería (beakers, tubos de ensayo, erlenmeyer, micropipetas, pipetas, probetas).
- Perillas de succión.
- Papel filtro.
- Baño María.
- Cámaras cromatográficas.
- Cromatofolios de aluminio de silica gel 60 F254 o placas de vidrio.
- Micropipetas de 5 μL o capilares.
- Asperjador de vidrio.
- Estufa.
- Agitador magnético.
- Estándares según el ensayo.
- Lámpara de luz UV (254 y 365 nm).
- Regla.

7. DISCUSIÓN

Guatemala, es un país en el cual la medicina tradicional tiene un lugar preponderante (Cáceres, 1999), lo cual se ha traducido en la fabricación, importación y comercialización de productos fitoterapéuticos, los cuales se rigen bajo los estándares de calidad establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.56:09) para Productos Farmacéuticos, Productos Naturales Medicinales para Uso Humano, Verificación de la Calidad. Sin embargo, se encuentra en evaluación el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.69:13) para Productos Farmacéuticos, Productos Naturales Medicinales para Uso Humano y Buenas Prácticas de Manufactura; reglamento en el cual se establece la evaluación de la estabilidad de los productos naturales medicinales para uso humano:

De la estabilidad.

El laboratorio fabricante debe garantizar la estabilidad de los productos que comercializan, así como establecer el tiempo de vida útil de los mismos. Debe contar con el personal, equipo, instalaciones y documentación necesarios para establecer el programa de estabilidad para los productos que fabrica y cumplir con la reglamentación centroamericana vigente.

Del análisis de los productos fitoterapéuticos con registro vigente al 18 de marzo de 2013, se encuentra que de los 993 productos; 408 son preparaciones que contienen una sola droga vegetal, por lo que la evaluación de los metabolitos secundarios en la huella cromatográfica se facilita, en buena parte, ya que existe literatura que especifica la huella cromatográfica de plantas medicinales (Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, American Herbal Products Association, USP Herbal Medicines Compendium).

Respecto a los preparados fitoterapéuticos, que son combinaciones de dos o más drogas vegetales, surge un reto para los laboratorios fabricantes, ya que al ser combinaciones únicas se deben desarrollar metodologías propias para el análisis de las mismas, basándose en los metabolitos secundarios predominantes en el preparado fitoterapéutico para la obtención de la huella cromatográfica específica.

Un ejemplo de lo anterior, lo ha desarrollado el laboratorio alemán de productos fitoterapéuticos MAD AUS, para su producto Salviathymol®, del cual cada gramo contiene: 2 mg de *Salvia aetheroleum* (estandarizado \geq 40% de thujone), 2 mg de *Eucalypti*

aetheroleum (estandarizado $\geq 75\%$ de cineole), 23 mg de *Menthae pip. aetheroleum* (estandarizado $\geq 50\%$ de mentol), 2 mg de *Cinnamomi aetheroleum* (estandarizado $\geq 75\%$ cinnamaldehído), 5 mg *Caryophylli aetheroleum* (estandarizado $\geq 80\%$ eugenol), 10 mg *Foeniculi aetheroleum* (estandarizado $\geq 60\%$ anethole y ≥ 10 fenchona), 5 mg *Anisi aetheroleum* (estandarizado $\geq 90\%$ antethole), 10 mg Myrrhae tintura (DAB 10), 4 mg Ranthanbiae tintura (DAB 10), 20 mg Alchemillae tintura (1:5), 20 mg mentol, 1 mg thymol, 6 mg fenilsalicilato, 0.4 mg guajazuleno, el sistema de solventes utilizado es tolueno : acetato de etilo (93:7), revelador vainillina-ácido sulfúrico o reactivo de ácido fosfomolibdico, para la detección de aceites esenciales. (Cromatograma en Anexo 5)

Supongamos que se tiene un producto cuya indicación es el tratamiento de trastornos digestivos: dispepsia, flatulencia, espasmos gastrointestinales leves (Anexo 6), cuya composición es Ajenjo (*Artemisia absinthium*) sumidad florida (100 mg), Manzanilla (*Matricaria recutita*) inflorescencia (100 mg), Menta (*Mentha piperita*) hojas (100 mg), Milenrama (*Achillea millefolium*) sumidades floridas (15 mg), Hinojo (*Foeniculum vulgare*) fruto (15 mg), Salvia (*Salvia officinalis*) hojas (15 mg), Regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) raíz (15 mg), se procede a revisar la composición química y cromatografías en capa fina que se encuentran en la literatura científica recomendada (Anexos 1, 2, 3) y se encuentra que las principales drogas vegetales (ajenjo, manzanilla y menta) son ricos en aceites esenciales, por lo tanto, la cromatografía para la determinación de la huella cromatográfica será basada en los compuestos terpénicos que componen los aceites esenciales de las drogas vegetales contenidas en el preparado fitoterapéutico. Los compuestos minoritarios en este caso no se toman en cuenta, ya que están en una menor proporción por lo que será muy difícil detectar sus compontes; sin embargo, estos si afectarán la huella cromatográfica final del producto.

Ahora supongamos, que se analizará un producto fitoterapéutico que se conforma de varias drogas vegetales en igual proporción, pero poseen metabolitos secundarios mayoritarios pertenecientes a distintas familias químicas; entonces, se recomienda realizar cromatografías en capa fina de todos metabolitos secundarios mayoritarios, y así determinar, con qué metabolito secundario se obtiene la mejor huella cromatográfica para la determinación de la estabilidad de este producto fitoterapéutico en particular.

Respecto a las plantas que mayormente se encuentran en los preparados fitoterapéuticos registrados en Guatemala (Tabla No. 1), se observa que en su mayoría son plantas cuyo uso es respaldado con estudios e información científica que avala su actividad farmacológica, lo anterior es una ventaja al momento de realizar el control de calidad (específicamente huella cromatográfica); ya que se dispone de información referente a los principales metabolitos secundarios de las drogas vegetales. Las principales fuentes de información que se pueden consultar son: Análisis de Drogas Vegetales: Atlas de Cromatografía de Capa Fina (Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, 2da ed. Wagner and Bladt), sitios web de American Herbal Products Association, AHPA y USP® Herbal Medicines Compendium, donde se encuentran descritos métodos analíticos para llevar a cabo cromatografía de capa fina de algunas drogas vegetales. (Anexos 1, 2, 3).

Dentro de las formas farmacéuticas principalmente utilizadas (Tabla No. 2), se observa que son formas que no requieren ningún tratamiento especial para realizar el extracto a sembrar en la placa cromatográfica; ya que en su mayoría son los polvos de las drogas vegetales (cápsulas, plantas en polvo para infusión, polvo para suspensión oral) y extractos puros e incorporados a una forma líquida (tintura oral y solución oral y jarabe respectivamente), por lo que solamente hay que hacer la extracción de los metabolitos secundarios en el caso de los polvos de las drogas vegetales y extracción y/o concentración en el caso de las formas farmacéuticas líquidas. La extracción se realiza, según lo establecen las metodologías analíticas para las drogas vegetales, en el caso de productos fitoterapéuticos, con una sola droga vegetal, como Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas (Wagner y Bladt), metodologías USP® Herbal Medicines Compendium y AHPA; y según el metabolito de interés para el caso de productos fitoterapéuticos conteniendo dos o más drogas vegetales tal como lo establece Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas (Wagner y Bladt); sin embargo, estas metodologías se tienen que adaptar, mediante prueba y error, por el fabricante, de tal manera que se obtenga la mejor huella cromatográfica para la mezcla de drogas vegetales que componen el preparado fitoterapéutico.

En la propuesta para evaluar la estabilidad química de productos fitoterapéuticos en Guatemala, se propone validar el método, esto con el fin de asegurar que los resultados que

se emitirán sean exactos, precisos y reproducibles. La validación de los métodos deberá cumplir con lo establecido en el Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.39.06: Validación de Métodos Analíticos Medicamentos.

El actual Reglamento Técnico Centroamericano de Productos Farmacéuticos: Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano (RTCA 11.01.04:10), estableció que las sustancias químicamente definidas, excepto los productos fitoterapéuticos, contienen droga(s) vegetal(e)s con una multiplicidad de compuestos químicos. Para los productos fitoterapéuticos, la evaluación bajo condiciones de estabilidad acelerada o intermedia se debe de omitir, ya que la mayoría de estos productos se degradan a 30°C/ 65 por ciento de humedad relativa (HR) y 40°C/ 75 por ciento HR. Se recomienda que la estabilidad de los preparados fitoterapéuticos se evalúe a 25°C/ 60 por ciento HR. (Kruse, S y K. Sultan, 2010).

Para hacer la cuantificación y respectiva evaluación de la estabilidad, se recomienda la utilización de programas de computación gratuitos como TLC Analyzer (Thin Layer Chromatography, por sus siglas en inglés) o JustQuantify de JustTLC, con los cuales se pueden cuantificar de una manera confiable y gratuita los metabolitos secundarios de interés (marcadores) en los productos fitoterapéuticos en el proceso de evaluación de estabilidad (tiempos 0, 6, 12, 18 y 24 meses).

En la Guía de Calidad de los Productos Medicinales Herbarios/Tradicionales (Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products, European Medicines Agency EMA, 2011), se establece que los productos fitoterapéuticos que contienen una droga vegetal o combinación de drogas vegetales con **actividad terapéutica conocida**, la variación en el contenido de los metabolitos secundarios en el tiempo de vida útil no debe de exceder $\pm 5\%$ del valor del ensayo, a menos que se justifique. En el caso de un producto fitoterapéutico conteniendo una droga vegetal o mezcla de estas, **donde se desconocen los constituyentes con actividad terapéutica**, la variación del marcador seleccionado en la estabilidad en anaquel puede ser del $\pm 10\%$, del ensayo inicial.

Dado que el preparado fitoterapéutico se considera una sustancia activa, en muchos casos, una simple determinación de la estabilidad de sus metabolitos secundarios con actividad

terapéutica conocida no bastará. La estabilidad de otras sustancias presentes en el preparado fitoterapéutico, deben, en la medida de lo posible, ser demostrada mediante las huellas cromatográficas: se debe demostrar que la huella cromatográfica a través del tiempo de vida útil es comparable con la huella cromatográfica inicial. (EMA, 2011).

Para evaluar la estabilidad de preparado fitoterapéutico, se recomienda la evaluación por triplicado de tres lotes del mismo.

Es importante mencionar que previo al inicio de estudio de estabilidad de los productos fitoterapéuticos, se tienen que definir las especificaciones de calidad fisicoquímica de los metabolitos secundarios de interés (marcadores), con ayuda de la literatura científica según la(s) droga(s) vegetales que las componen.

Cada laboratorio fabricante es el responsable de garantizar la vida útil de los productos fitoterapéuticos que producen; además, de los métodos de evaluación de estabilidad química. En Guatemala, la mayoría de drogas vegetales utilizadas se encuentran en la literatura científica, por lo que, los laboratorios deben de adaptar dichas marchas analíticas a sus condiciones propias, para obtener la mejor huella cromatográfica posible, y así evaluar la estabilidad de los principales marcadores, a través del tiempo ($t = 0, 6, 12, 18$ y 24 meses) en condiciones de $25^{\circ}\text{C}/ 60$ por ciento HR, cuya cuantificación no debe de variar en $\pm 5\%$ y $\pm 10\%$ para preparados fitoterapéuticos conteniendo una y más de una droga vegetal, respectivamente.

8. CONCLUSIONES

1. Se estableció una propuesta de guía para la evaluación de la estabilidad química de los productos fitoterapéuticos en Guatemala, basada en la cantidad de drogas vegetales que la conforman, verificación de la metodología analítica existente de las drogas vegetales que componen el preparado fitoterapéutico, extracción del metabolito secundario a analizar, realización y validación de cromatografía en capa fina del principal metabolito secundario del preparado fitoterapéutico y cuantificación del mismo a través del tiempo (0, 6, 12, 18 y 24 meses).
2. Entre las drogas mayormente utilizadas en productos fitoterapéuticos en Guatemala, se encuentran Pasiflora (*Passiflora incarnata*), Valeriana (*Valeriana officinalis*), Ginseng (*Panax ginseng*), Tilo (*Tilia* sp.), Ginkgo (*Ginkgo biloba*), Menta (*Mentha piperita*), Alcachofa (*Cynara scolymus*), Maca (*Lepidium meyenii*; *L. peruvianum*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), Equinacea (*Echinacea purpurea*), Saw palmetto (*Serenoa repens*), Boldo (*Peumus boldus*), Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Naranja (*Citrus aurantium*), Ortiga (*Urtica dioica*), Damiana (*Turnera difussa*) y Fenogreco (*Trigonella foenum graecum*).
3. Las cápsulas, es la forma farmacéutica mayormente utilizada en los productos fitoterapéuticos en Guatemala.
4. Cada laboratorio fabricante es el responsable de garantizar la vida útil de los productos fitoterapéuticos que producen, por lo que los métodos de evaluación de estabilidad química se deben de adaptar de la literatura científica disponible: Atlas de Cromatografía de Capa Fina (Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, 2da ed. Wagner and Bladt) y sitios web de American Herbal Association, AHPA y USP® Herbal Medicines Compendium.
5. Se debe contar con los reactivos específicos (solventes, estándares y reveladores) para la evaluación de la estabilidad química del metabolito secundario, específico del producto fitoterapéutico en análisis.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda al sector regulatorio (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala) y sector empresarial, lo siguiente:

1. Capacitar al personal encargado de la evaluación (química) de los productos fitoterapéuticos,
2. Promover controles de calidad más estrictos de los productos fitoterapéuticos, de tal manera que se pueda asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los mismos.
3. Invertir en la infraestructura y materiales necesarios (estándares y solventes específicos) para la evaluación de la estabilidad química de los preparados fitoterapéuticos y/o promover el funcionamiento de un laboratorio que brinde el anterior servicio.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, I., Aqil, F y Owais, M. (2006) *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527609987
- American Herbal Products Association (disponible en <http://www.botanicalauthentication.org/index.php/Category:Botanical>) revisado el 15 de octubre de 2015
- ANH Consultancy Ltd. (2009). Response to Reflection Paper by European Medicines Agency (EMA) on Stability Testing of Herbal Medicinal Products and Traditional Herbal Medicinal Products. Recuperado de [http://anh-europe.org/files/090515 ANH submission to EMA stability data no names.pdf](http://anh-europe.org/files/090515_ANH_submission_to_EMEA_stability_data_no_names.pdf)
- Avello, M & Cisternas, F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile*, 138(10), 1288-1293.
- Bandaranayake, W. M. (2006) Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. Ahmad, F. Aqil and M. Owais (eds) *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527609987.
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. (2003). Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22(3), 265-278.
- Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC (2010). Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. European Medicines Agency
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) & Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2011). *Guideline on quality of herbal medicinal products/*

traditional herbal medicinal products – Final. London: European Medicines Agency. Recuperado de http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113209.pdf

Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2010). *Reflection Paper on Stability Testing of Herbal Medicinal Products and Traditional Herbal Medicinal Products - Final*. London: European Medicines Agency. Recuperado de http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/11/WC500098816.pdf

Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2013). Questions & answers on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. London: European Medicines Agency. Recuperado de http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/09/WC50003093.pdf

Irish Hess, 2007. Digitally Enhanced Thin-Layer Chromatography: An Inexpensive, New Technique for Qualitative and Quantitative Analysis, *Journal of Chemical Education*, Vol 84 No. 5, www.JCE.DivCHED.org

Kamboj, A. (2012). Analytical evaluation of herbal drugs. En Vallisuta, O. & Olimat, S.M. (Ed.), *Drug Discovery Research in Pharmacognosy* (23-60). Rijeka: InTech

Kruse, S. O. & Sultan, K. (2010). Stability Testing of Herbal Medicinal Products. *Innovations in Pharmaceutical Technology (IPT)*. 33(2010) 64-68 Recuperado de http://www.diapharm.com/download/aktuelles/english/IPT_33_2010.pdf

Kunle, O. F., Egharevba, H. O. & Ahmadu, P. O. (2012). Standarization of herbal medicines – A Review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 101-112. doi: 10.5897/IJBC11.163.

Maiti, B., Nagori, B., Singh, R., Kumar, P., & Upadhyay N. (2011). Recent trends in herbal drugs: A Review. *International Journal of Drug Research and Technology*, 1(1), 17-25.

Organización Mundial de la Salud. (2000). *Situación Reglamentaria de los Medicamentos Herbarios: Una Reseña Mundial*. Geneva: Organización Mundial de la Salud.
Recuperado de: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jwhozip58s/>

Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas, 2da ed. Wagner y Bladt. 2001.

Procedimiento Estándar de Operación del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT

Regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos. Ministerio de la Protección Social Colombia § 2266 (2004)

Reglamento Técnico Centroamericano RTCA.11.03.56:09. Productos Farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales para Uso Humano. Verificación de la Calidad. Ministerio de Economía, MINECO, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC, Secretaría de Industria y Comercio, SIC, Ministerio de Economía, Industria y Comercio, MEIC § 2266 (2011)

Thakur L., Ghodasra, U., Patel, N. & Dabhi, M. (2011). Novel approaches for stability improvement in natural medicines. *Pharmacognosy Review*, 5(9), 48-54. doi: 10.4103/0973-7847.79099.

USP® Herbal Medicines Compendium (disponible en <http://hmc.usp.org/>) revisado el 15 de octubre de 2015

11. ANEXOS

ANEXO 1: Cromatografías en capa fina de drogas vegetales contenidas en Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas, 2da ed. Wagner y Bladt. 2001.

Drogas Vegetales conteniendo Alcaloides
Aconiti tuber
Berberidis cortex
Boldo folium
Catharanthi folium
Chelidonii herba
Chhinae cortex
Colchici semen
Colombo radix
Corydalis rizoma
Ephedrae herba
Fumariae herba
Gelsemii radix
Genistae herba
Harmalae semen
Hydrastis rizoma
Ipecacuanhae radix
Justiciae-adjatodae folium
Lobeliae herba
Mahoniae radix/cortex
Nicotianae folium
Opium
Quebracho cortex
Rauvolfiae radix
Sabadillae semen
Sarothamni herba
Secale cornutum
Solanaceae drugs
Spartii flos
Strychni e Ignatii seman
Uncariae radix
Vincae monoris folium
Yohimbe cortex

Drogas Vegetales conteniendo Derivados Antracénicos
--

Aloes
Hyperici herba
Rhamnus, especies de
Rhei radix
Sennae folium/fructus

Drogas Vegetales conteniendo Principios Amargos
--

Absinthii herba
Centaurii herba
Cnici herba
Cynarae herba
Gentianae radix
Marrubii herba
Menyanthidis folium
Oleae folium
Quassiae lignum

Drogas Vegetales conteniendo Glicósidos Cardiotónicos
--

Adonidis herba
Cheiranthi herba
Convallariae herba
Digitalis folium
Erysimi herba
Helleborus, especies de
Nerii (Oleandri) folium
Scillae bulbus
Strophanthi semen
Uzarae (Xysmalobii) radix

Drogas Vegetales conteniendo Cumarinas
Abrotani herba
Ammi fructus
Angelicae radix
Apiaceae radix
Asperulae herba
Belladonnae Mandragorae radix
Fabiani herba
Fraxini cortex
Herniariae herba
Imperatoriae radix
Levistici radix
Meliloti herba
Mezerei cortex
Rutae herba
Scopoliae radix
Toncae semen

Drogas Vegetales conteniendo Aceites Esenciales, Bálsamos y Oleo Resinas
Ajowani fructus
Anisi fructus
Anthemidis et Cinae flos
Asari radix
Aurantii et Citri pericarpium
Basilici herba
Benzoina y balsámos
Calami rizoma
Cardamomi fructus
Carvi fructus
Caryophylli flos
Cinnamomi cortex
Coriandri fructus
Curcumae rhizome
Eucalypti folium
Foeniculi fructus
Juniperi aetherolea, Myrrha
Lavandulae flos (Lamiaceae)
Matricariae flos
Melissae folium (Lamiaceae)
Menthae crispae folium
Menthae folium (Lamiaceae)

Myristicae semen
Petroselini fructus
Pini aetherolea
Rosmarini folium (Lamiaceae)
Salviae folium
Sassagras lignum
Serphylli herba
Terebinthinae aetherolea
Thymi herba

**Drogas Vegetales conteniendo Flavonoides,
incluyendo Ginkgo biloba y Echinaceae**

Acaciae flos
Anserinae gemmae
Arnicae flos
Betulae folium
Cacti flos
Calendulae flos
Cardui mariae (Silybi) fructus
Castanae folium
Citri aurantii pericarpium
Crataegi folium/fructus flos
Echinacea radix
Equiseti herba
Eriodictyonis folium
Farfae folium/flos
Ginkgo bilobae folium
Juglandis Rubi folium
Lespedezae herba
Orthosiphonis folium
Passiflorae herba
Petasitidis folium/radix
Primulae flos
Pruni spinosae
Ribis folium
Robiniae
Sambuci flos
Sophorae gemmae
Spiraeae flos
Tiliae flos
Viburni cortex
Violae herba

Drogas vegetales conteniendo Arbutina, Salicina y Derivados de Salicoil
--

Arbutin, drogas vegetales
Salicis cortex

Drogas Vegetales conteniendo Cannabinoides y Kavapironas

Cannabis herba
Hashish
Kava-kava rhizoma
Piper methysticum

Drogas Vegetales conteniendo Lignanos
--

Cubebae fructus
Eleutherococci radix (rhizoma)
Podophylli rhizoma
Viscum álbum

Drogas Vegetales conteniendo 1,4- Naftoquinonas (Drosera herba, Dionaeae herba)
--

Dionaeae herba
Droserae herba

Drogas Vegetales conteniendo Pigmentos

Croci stigma
Hibisci flos
Myrtilli fructus

Drogas Vegetales conteniendo Principios Amargos
Allium, spp
Capsici fructus
Capsici fructus
Galangae rhizoma
Piperis fructus
Sinapis semen
Zingiberis rhizoma

Drogas Vegetales conteniendo Saponinas
Avenae sativae
Centellae herba
Ginseng radix
Hederae folium
Hippocastani semen
Liquiritiae radix
Primulae radix
Quillajae cortex
Rusci rhizoma
Saponariae radix

Drogas Vegetales conteniendo Triterpenos
Cimicifugae rhizoma
Ononidis radix

Drogas vegetales conteniendo Valepotriatos (Valerianae radix)
Valerianae radix

ANEXO 2: Cromatografías en capa fina de drogas vegetales contenidas en el sitio web de American Herbal Products Association (disponible en <http://www.botanicalauthentication.org/index.php/Category:Botanical>) revisado el 15 de octubre de 2015

A
<i>Acacia senegal</i> (goma)
<i>Achillea millefolium</i> (flores)
<i>Aconitum napellus</i> (hojas)
<i>Aconitum napellus</i> (raíz)
<i>Actaea racemosa</i> (raíz y rizoma)
<i>Aesculus hippocastanum</i> (semillas)
<i>Agathosma betulina</i> (hojas)
<i>Agrimonia eupatoria</i> (botones florales)
<i>Allium sativum</i> (bulb)
<i>Aloe vera</i> (hojas filtradas/jugo de la hoja interna)
<i>Aloysia citrodora</i> (hojas)
<i>Althaea officinalis</i> (raíz)
<i>Amomum</i> spp. (fruto)
<i>Angelica dahurica</i> (raíz)
<i>Angelica pubescens</i> (raíz)
<i>Angelica sinensis</i> (raíz)
<i>Apium graveolens</i> (semillas)
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (hojas)
<i>Arnebia</i> spp. (raíz)
<i>Arnica montana</i> (flores)
<i>Artemisia absinthium</i> (hojas)
<i>Artemisia annua</i> (hojas)
<i>Ascophyllum nodosum</i> (algas)
<i>Astragalus membranaceus</i> (raíz)
<i>Avena sativa</i> (hierba)

B
<i>Bacopa monnieri</i> (planta entera)
<i>Berberis aquifolium</i> (raíz)
<i>Berberis vulgaris</i> (corteza)
<i>Bupleurum chinense</i> (raíz)

C
<i>Calendula officinalis</i> (flores)
<i>Camellia sinensis</i> (hojas)
<i>Cannabis</i> spp. (pistilos de la inflorescencia and hojas)
<i>Capsicum annuum</i> (fruto)
<i>Carthamus tinctorius</i> (flores)
<i>Carum carvi</i> (fruto)
<i>Caulophyllum thalictroides</i> (raíz)
<i>Centella asiatica</i> (partes aéreas)
<i>Ceratonia siliqua</i> (semillas)
<i>Chamaemelum nobile</i> (flores)
<i>Cichorium intybus</i> (raíz)
<i>Cinnamomum aromaticum</i> (corteza)
<i>Cinnamomum loureiroi</i> (corteza)
<i>Cinnamomum verum</i> (corteza)
<i>Citrus paradisi</i> (semillas)
<i>Clematis armandii</i> (raíz)
<i>Cnidium monnieri</i> (semillas)
<i>Coix lacryma-jobi</i> (semillas)
<i>Cola nitida</i> (nut)
<i>Coleous forskohlii</i> (raíz)
<i>Coriandrum sativum</i> (semillas)
<i>Crataegus laevigata</i> (fruto)
<i>Crataegus laevigata</i> (hojas)
<i>Cucurbita pepo</i> (semillas)
<i>Cuminum cyminum</i> (semillas)
<i>Curcuma longa</i> (rizoma)
<i>Cyathula officinalis</i> (raíz)

D
<i>Drynaria fortunei</i> (rizoma)

E
<i>Echinacea angustifolia</i> (raíz)
<i>Echinacea pallida</i> (raíz)
<i>Echinacea purpurea</i> (raíz)
<i>Eclipta prostrata</i> (partes aéreas)
<i>Elettaria cardamomum</i> (fruto)
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (corteza de la raíz)
<i>Elymus repens</i> (raíz)
<i>Epimedium grandiflorum</i> (hojas)
<i>Equisetum palustre</i> (hojas)
<i>Eucalyptus globulus</i> (hojas)
<i>Euphrasia officinalis</i> (partes aéreas)
<i>Euterpe oleracea</i> (fruto)

F
<i>Filipendula ulmaria</i> (hojas)
<i>Foeniculum vulgare</i> (fruto)
<i>Frangula purshiana</i> (corteza)
<i>Fraxinus</i> spp. (hojas)
<i>Fucus vesiculosus</i> (seaweed)

G
<i>Ganoderma lucidum</i> (fruto)
<i>Garcinia hanburyi</i> (goma resina)
<i>Ginkgo biloba</i> (hojas)
<i>Glycine max</i> (semilla)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> (raíz)
<i>Gymnema sylvestre</i> (hojas)

H
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (corteza)
<i>Harpagophytum</i> spp. (raíz)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> (flores)
<i>Hoodia gordonii</i> (partes aéreas)
<i>Hordeum vulgare</i> (hojas)
<i>Humulus lupulus</i> (strobile)
<i>Hydrangea arborescens</i> (raíz)
<i>Hydrastis canadensis</i> (partes aéreas)
<i>Hydrastis canadensis</i> (raíz)
<i>Hypericum perforatum</i> (botones florales)

I
<i>Ilex paraguariensis</i> (hojas)
<i>Illicium verum</i> (fruto)
<i>Isatis tinctoria</i> (raíz)

J
<i>Juglans nigra</i> (hull)
<i>Juniperus communis</i> (fruto)
<i>Justicia adhatoda</i> (hojas)

L
<i>Lactuca virosa</i> (hojas)
<i>Laminaria digitata</i> (thallus)
<i>Lavandula angustifolia</i> (flores)
<i>Lavandula latifolia</i> (flores)
<i>Lepidium meyenii</i> (raíz)
<i>Levisticum officinale</i> (raíz)
<i>Ligusticum</i> spp. (raíz)
<i>Ligustrum lucidum</i> (fruto)
<i>Linum usitatissimum</i> (semillas)
<i>Lycium barbarum</i> (fruto)

M
<i>Magnolia officinalis</i> (corteza)
<i>Malus pumila</i> (fruto)
<i>Malva sylvestris</i> (flores)
<i>Manihot esculenta</i> (raíz)
<i>Matricaria recutita</i> (flores)
<i>Medicago sativa</i> (hojas)
<i>Melissa officinalis</i> (hojas)
<i>Mentha ×piperita</i> (hojas)
<i>Monarda didyma</i> (hojas)
<i>Morinda citrifolia</i> (fruto)
<i>Mucuna pruriens</i> (semillas)

N
<i>Nasturtium officinale</i> (hojas)

O
<i>Ocimum tenuiflorum</i> (hojas)
<i>Olea europaea</i> (hojas)
<i>Origanum vulgare</i> (hojas y flores)

P
<i>Palmaria palmata</i> (alga)
<i>Panax ginseng</i> (raíz)
<i>Panax quinquefolius</i> (raíz)
<i>Passiflora incarnata</i> (partes aéreas)
<i>Paullinia cupana</i> (semillas)
<i>Pausinystalia johimbe</i> (corteza)
<i>Peumus boldus</i> (hojas)
<i>Phyllanthus amarus</i> (partes aéreas)
<i>Phyllanthus emblica</i> (fruto)
<i>Pimpinella anisum</i> (fruto)
<i>Piper longum</i> (fruto)
<i>Piper methysticum</i> (rizoma)
<i>Piper methysticum</i> (raíz)
<i>Piper nigrum</i> (fruto)
<i>Plantago lanceolata</i> (hojas)
<i>Plantago ovata</i> (semillas husk)
<i>Primula veris</i> (flores)
<i>Prunus africana</i> (corteza)
<i>Pueraria</i> spp. (raíz)

R
<i>Rehmannia glutinosa</i> (raíz)
<i>Reynoutria multiflora</i> (raíz)
<i>Rosa canina</i> (fruto)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (partes aéreas)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (hojas)
<i>Ruscus aculeatus</i> (rizoma)

S
<i>Salix</i> spp. (corteza)
<i>Salvia columbariae</i> (semillas)
<i>Salvia fruticosa</i> (hojas)
<i>Salvia hispanica</i> (semillas)
<i>Salvia lavandulifolia</i> (hojas)
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (raíz)
<i>Salvia officinalis</i> (hojas)
<i>Sambucus nigra</i> (flores)
<i>Sambucus nigra</i> (fruto)
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (raíz)
<i>Saussurea costus</i> (raíz)
<i>Scutellaria lateriflora</i> (partes aéreas)
<i>Scutellaria lateriflora</i> (flores)
<i>Senna alexandrina</i> (hojas)
<i>Serenoa repens</i> (fruto)
<i>Sesamum indicum</i> (semillas)
<i>Silybum marianum</i> (fruto)
<i>Silybum marianum</i> (semillas)
<i>Smilax aristolochiifolia</i> (raíz)
<i>Solidago gigantea</i> (partes aéreas)
<i>Solidago virgaurea</i> (partes aéreas)
<i>Stellaria media</i> (hojas)
<i>Stephania tetrandra</i> (raíz)
<i>Stevia rebaudiana</i> (hojas)

T
<i>Tanacetum parthenium</i> (flores)
<i>Tanacetum parthenium</i> (hojas)
<i>Taraxacum officinale</i> (raíz)
<i>Terminalia bellerica</i> (fruto)
<i>Terminalia chebula</i> (fruto)
<i>Theobroma cacao</i> (fruto)
<i>Tilia ×europaea</i> (flores)
<i>Trifolium pratense</i> (flores)
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (semillas)
<i>Triticum aestivum</i> (hojas)
<i>Turnera diffusa</i> (hojas)

U
<i>Ulmus rubra</i> (corteza)
<i>Uncaria tomentosa</i> (raíz)

V
<i>Vaccinium macrocarpon</i> (fruto)
<i>Vaccinium myrtillus</i> (fruto)
<i>Valeriana officinalis</i> (raíz)
<i>Verbascum</i> spp. (flores)
<i>Verbena officinalis</i> (partes aéreas)
<i>Viola</i> spp. (partes aéreas)
<i>Vitis vinifera</i> (semillas)
<i>Vladimiria souliei</i> (raíz)

W
<i>Withania somnifera</i> (raíz)

Z
<i>Zingiber officinale</i> (rizoma)
<i>Ziziphus jujube</i> var. <i>spinosa</i> (semillas)

ANEXO 3: Cromatografías en capa fina de drogas vegetales contenidas USP® Herbal Medicines Compendium (disponible en <http://hmc.usp.org/>) revisado el 15 de octubre de 2015

A
<i>Ammi majus</i> Fruto
<i>Ammi visnaga</i> Fruto
<i>Antrodia camphorata</i> Cuerpo frutal
<i>Antrodia camphorata</i> Cuerpo frutal, extracto seco
<i>Antrodia camphorata</i> Cuerpo frutal, polvo
<i>Atropa belladonna</i> Hojas

C
<i>Cinnamomum cassia</i> Corteza
<i>Cinnamomum cassia</i> Corteza polvo
<i>Coix lacryma-jobi</i> Semillas
<i>Coix lacryma-jobi</i> Semillas polvo
<i>Croton lechleri</i> Látex

D
<i>Dioscorea polystachya</i> Rizoma

G
<i>Ganoderma lucidum</i> Cuerpo frutal
<i>Ganoderma lucidum</i> Cuerpo frutal, extracto seco
<i>Ganoderma lucidum</i> Cuerpo frutal, polvo

H
<i>Harpagophytum</i> spp. Raíz
<i>Hibiscus sabdariffa</i> Flores

L
<i>Lagerstroemia speciosa</i> Hojas
<i>Lagerstroemia speciosa</i> Hojas, extracto seco
<i>Lagerstroemia speciosa</i> Hojas, polvo
<i>Lepidium meyenii</i> Rizoma
<i>Lonicera japonica</i> Flores
<i>Lonicera japonica</i> Flores, extracto seco
<i>Lonicera japonica</i> Flores, polvo
<i>Lycium barbarum</i> Fruto

M
<i>Mangifera indica</i> Corteza
<i>Mangifera indica</i> Corteza, extracto seco
<i>Mangifera indica</i> Corteza, polvo

N
<i>Nigella sativa</i> Semillas

P
<i>Paeonia</i> spp Raíz
<i>Panax ginseng</i> Raíz y rizoma
<i>Panax ginseng</i> Raíz y rizoma, extracto seco
<i>Panax ginseng</i> Raíz y rizoma, polvo
<i>Panax notoginseng</i> Raíz y rizoma
<i>Panax notoginseng</i> Raíz y rizoma, extracto seco
<i>Panax notoginseng</i> Raíz y rizoma, polvo
<i>Paullinia cupana</i> Semillas
<i>Pelargonium sidoides</i> Raíz
<i>Peumus boldus</i> Hojas
<i>Phyllanthus amarus</i> Partes aéreas
<i>Phyllanthus amarus</i> Partes aéreas, polvo
<i>Phyllanthus amarus</i> Partes aéreas, extracto seco
<i>Picrorhiza kurrooa</i> Raíz and rizoma
<i>Picrorhiza kurrooa</i> Raíz y rizoma, extracto seco
<i>Picrorhiza kurrooa</i> Raíz y rizoma, polvo
<i>Piper methysticum</i> Raíz y rizoma
<i>Piper methysticum</i> Raíz y rizoma, polvo
<i>Piper methysticum</i> Raíz, extracto seco
<i>Polygonum multiflorum</i> Raíz

<i>Polygonum multiflorum</i> Raíz, extracto seco
<i>Polygonum multiflorum</i> Raíz, polvo
<i>Pterocarpus marsupium</i> Heartwood
<i>Pterocarpus marsupium</i> Heartwood Powder

R
<i>Rehmannia glutinosa</i> Raíz
<i>Rhodiola crenulata</i> Raíz y rizoma
<i>Rhodiola crenulata</i> Raíz y rizoma, extracto seco
<i>Rhodiola crenulata</i> Raíz y rizoma, polvo
<i>Rhodiola rosea</i> Raíz y rizoma
<i>Rhodiola rosea</i> Raíz y rizoma, extracto seco
<i>Rhodiola rosea</i> Raíz y rizoma, polvo
<i>Rhodiola rosea</i> Raíz y rizoma, tintura

S
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Raíz y rizoma
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Raíz y rizoma, extracto seco
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Raíz y rizoma, polvo
<i>Sceletium tortuosum</i> Partes aéreas
<i>Schisandra chinensis</i> Fruto
<i>Schisandra chinensis</i> Fruto, extracto seco
<i>Schisandra chinensis</i> Fruto, polvo
<i>Sphaeranthus indicus</i> Partes aéreas
<i>Sphaeranthus indicus</i> Partes aéreas, extracto seco
<i>Sphaeranthus indicus</i> Partes aéreas, polvo

T
<i>Terminalia chebula</i> Fruto
<i>Terminalia chebula</i> Fruto, extracto seco
<i>Terminalia chebula</i> Fruto polvo
<i>Trigonella foenum-graecum</i> Semillas
<i>Trigonella foenum-graecum</i> Extracto de semilla, estandarizado de 4-Hidroxiisoleucina
<i>Trigonella foenum-graecum</i> Semillas, extracto seco
<i>Trigonella foenum-graecum</i> Semillas, polvo
<i>Turnera diffusa</i> Hojas

V
<i>Vitex negundo</i> Hojas
<i>Vitex negundo</i> Hojas, extracto seco
<i>Vitex negundo</i> Hojas, polvo

Z
<i>Ziziphus jujuba</i> Fruto
<i>Ziziphus jujuba</i> Fruto, polvo
<i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i> Semillas

ANEXO 4: Cuantificación de compuestos en cromatografía de capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC), es a menudo utilizada como un método *cualitativo*. Puede determinar el número de componentes en una mezcla, verificar la identidad de las sustancias, monitorear el progreso de una reacción, o verificar la efectividad de una purificación. Ya que la TLC es fácil y práctica, muchos analistas utilizan métodos de TLC en sus laboratorios.

La TLC *cuantitativa*, está en el campo de la HPTLC (TLC de alta resolución). Las placas de HPTLC tienen partículas más finas que las placas regulares de TLC, y consecuentemente, son mejores para el análisis cuantitativo, aunque son más costosas. Las muestras en HPTLC son aplicadas mecánicamente (mediante dosímetros) y analizadas con un equipo automatizado (escáner de TLC).

Desafortunadamente, el equipo para el análisis de TLC cuantitativa es costoso, no es práctico para pequeñas empresas y laboratorios que realizan análisis.

En el estudio de Irish Hess, se demuestra que la fotografía digital combinada con TLC regular (digitalmente mejorada o DE-TLC), puede realizar análisis cualitativos altamente mejorados, así como realizar análisis cuantitativos exactos por un precio mucho menor que el equipo comercial disponible (el costo de una cámara digital es aproximadamente \$500 y el software es gratuito).

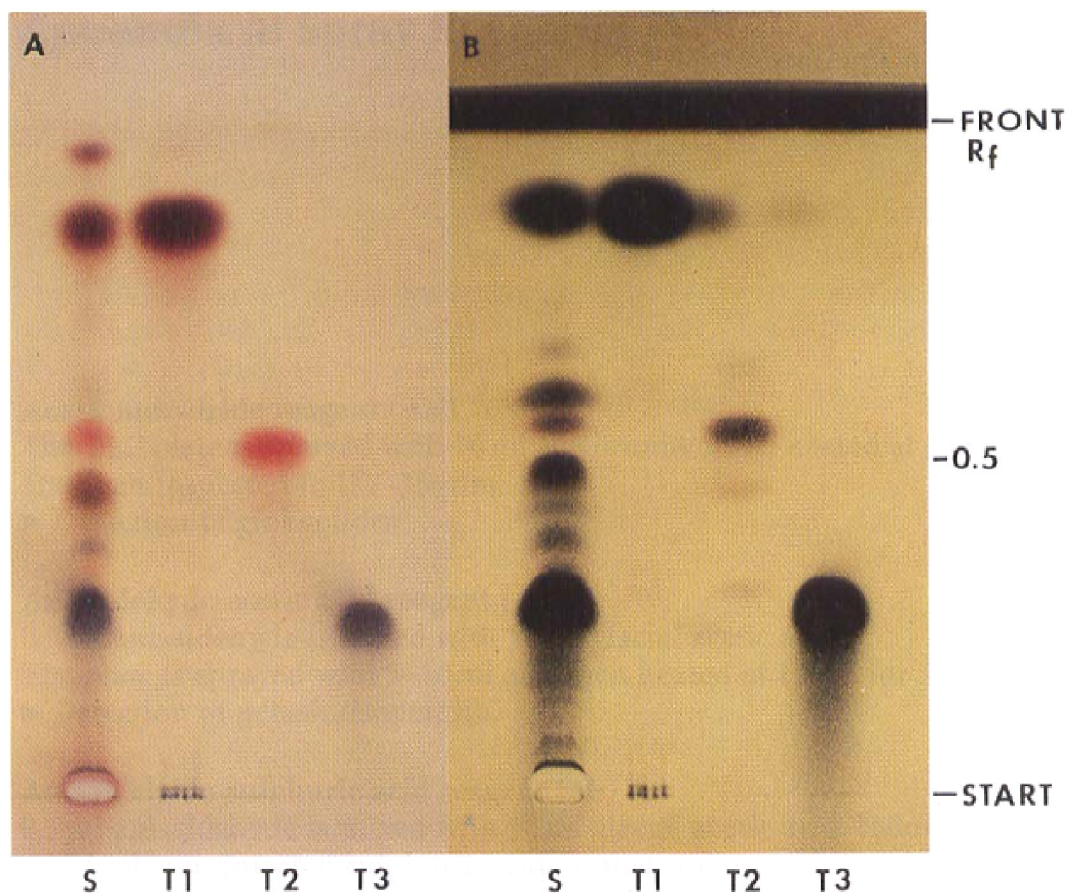
La DE-TLC es la primera técnica en utilizar una cámara digital y un software para separar la intensidad del rojo, verde y azul de la imagen de la placa de TLC para crear un escan multiespectro. Es como el espectrofotómetro de los “pobres”, siendo fácil de utilizar. DE-TLC utiliza comúnmente placas de TLC (no de HPTLC), una cámara digital con control de exposición manual y equipo común de TLC.

La DE-TLC puede ser utilizada por cualquier institución, especialmente aquellas que no tienen presupuesto para pagar equipo costoso para el análisis de TLC.

(Irish Hess, 2007. Digitally Enhanced Thin-Layer Chromatography: An Inexpensive, New Technique for Qualitative and Quantitative Analysis, Journal of Chemical Education, Vol 84 No. 5, www.JCE.DivCHED.org)

ANEXO 5: Cromatograma de Salviathymol®

Figura 1. Cromatograma de Salviathymol®



Fuente: Wagner y Blatt. 2001

Tabla No. 1. Interpretación del Cromatograma

Terpenoides Identificables	Valor R _f	Detección utilizando revelador Vainillina-Ácido Sulfúrico (visible)	Detección utilizando revelador Ácido Fosfomolibdico (visible)
Azuleno e hidrocarburos terpénicos	0.98	violeta azulado	azul
Anetol (▶ T1)	0.9	violeta azulado	azul
Tuyona (con ácido fosfomolibdico)	0.7	----	violeta rojizo
Timol ((▶ T2)	0.5	violeta rojizo	azul
Cinamaldehido/eugenol	0.45	naranja parduzco	azul
Cineol/Piperitona	0.4	naranja azulado	azul
Mentol (▶ T3)	0.2	azul	azul

Fuente: Wagner y Blatt. 2001

ANEXO 6: Ejemplo de selección de metabolito secundario para evaluación de huella cromatográfica en producto fitoterapéutico hipotético compuesto de varias drogas vegetales.

Ejemplo de producto fitoterapéutico hipotético para mejorar la digestión.

Composición cuali-cuantitativa

Cada cápsula contiene:

	mg/cápsula
Ajenjo (<i>Artemisia absinthium</i>) sumidad florida	100
Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>) inflorescencia,	100
Menta (<i>Mentha piperita</i>) hojas	100
Milenrama (<i>Achillea millefolium</i>) sumidades floridas	15
Hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>) fruto	15
Salvia (<i>Salvia officinalis</i>) hojas	15
Regaliz (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) raíz	15

Metabolitos secundarios de interés mayoritarios en las principales drogas vegetales que conforman el preparado fitoterapéutico luego de revisión de literatura:

ACEITES ESENCIALES

Droga Vegetal	Principales terpenos que conforman el aceite esencial
Ajenjo (<i>Artemisia absinthium</i>) planta entera	<ul style="list-style-type: none"> • Tuyona (1S,4R-tuyan-3-ona) • Acetato de trans-sabinilo • <i>Cis</i>-epoxiocimeno o acetato de crisantenilo
Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>) inflorescencia, extracto 4:1	<ul style="list-style-type: none"> • Óxido de bisabolol • Bisabolol, azuleno • Bisabolol (III)
Menta (<i>Mentha piperita</i>) hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Menthol • Acetato de metil • Mentona/isomentona • Mentofurano

ANEXO 7: Procedimientos de tamizaje fitoquímico por cromatografía en capa fina, según
Procedimiento Estándar de Operación del Laboratorio de Investigación de
Productos Naturales LIPRONAT

TAMIZAJE FITOQUIMICO

I. DEFINICIÓN:

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y análisis por cromatografía en capa fina. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensible, reproducibles y de bajo costo.

La cromatografía en capa fina, consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc) distribuido sobre una placa de vidrio o de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

Rf : factor de retención, es la medida de la migración de una sustancia determinada en un disolvente dado.

$$Rf: \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

II. OBJETIVO:

Proporcionar instrucciones para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en las diferentes especies vegetales, empleando técnicas macro y semimicro y cromatografía en capa fina.

III. RESPONSABLE:

Es responsabilidad de la persona designada el cumplimiento de este Procedimiento Estándar de Operación (PEO), este debe ser ejecutado de forma correcta para identificar los metabolitos secundarios presentes en una especie vegetal.

IV. DISTRIBUCIÓN:

Auxiliar de laboratorio.
Estudiantes.

V. MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS:

- Reactivos específicos para cada metabolito.
- Disolventes orgánicos según el ensayo.
- Ácidos y bases según el caso.
- Cristalería (beakers, tubos de ensayo, erlenmeyer, micropipetas, pipetas, probetas).
- Perillas de succión.
- Papel filtro.
- Baño María.
- Cámaras cromatográficas.
- Cromatofolios de aluminio de silica gel 60 F254 o placas de vidrio.
- Micropipetas de 5 μL o capilares.
- Asperjador de vidrio.
- Estufa.
- Agitador magnético.
- Estándares según el ensayo.
- Lámpara de luz UV.
- Regla.

VI. PROCEDIMIENTO:

Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: Pesar 1 g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego añadir 25 mL de metanol a 60°C. Filtrar con papel filtro Whatman 1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's. (Color blanco a crema).

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff. (Color rojo a naranja).

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner. (Color marrón).

Tubo 4: testigo.

Usar como estándar soluciones al 1 por ciento de atropina y papaverina. Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

Preparación de Reactivos:

Mayer's (yoduro de mercurio y potasio)

- a. 1.36 g de HgCl_2 / 60 mL H_2O
- b. 5 g KI / 10 mL H_2O
- c. Mezclar y diluir a 100 mL.

Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)

- a. 8 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / 20 mL HNO_3
- b. 27.2 g KI / 50 mL H_2O
- c. Mezclar, reposar, decantar supernadante. Diluir a 100 mL.

Wagner (yodo-yoduro de potasio)

- a. 1.27 g I_2 + 2 g KI / 5 mL H_2O
- b. Diluir a 100 mL.

Cromatografía en capa fina: Pesar 1 g de material vegetal seco y molido, agregar 1 mL de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v) y extraer con 5 mL de metanol. Colocar en baño maría a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60 F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10 μL).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10); acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), cloroformo- dietilamina (90:10); acetona-agua-amonio concentrado (90:7:3)

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo.

Reactivo de Dragendorff: zonas cafés o naranjas en vis, los colores no son estables.

Investigación de flavonoides y antocianinas:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 mL de metanol al 80 por ciento, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético.

Tubo 7: testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

Cromatografía en capa fina: Extraer 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µL). (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10)

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

Solución 1: solución metanólica al 1 por ciento de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas.

Investigación de antraquinonas:

Prueba de Bornträger: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar en baño de maría (60°C). Disolver el residuo con 30 mL de agua destilada y filtrar. Extraer con 10 mL de benceno. A la fase bencénica añadir 5 mL de solución de test de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Prueba de Bortränger modificado: Calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento y calentar 10 minutos en baño de maría a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10 mL de benceno. A la capa bencénica adicionar 5 mL de solución de prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Cromatografía en capa fina: Extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño maría (60°C) por 5 minutos. Filtrar y aplicar 10 µL en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: solución al 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas (10 µL). (Aloína, flangulina A/B, glucofrangulina A/B y sus agliconas, reina, aloe-emodina, extracto de sen)

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10).

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento.

Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365 nm.

Antronas y antranolas: zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm.

Investigación de cumarinas:

Ensayos macro y semimicro: Medir 5 mL de extracto vegetal metanólico. Agregar 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N. Observar bajo luz ultravioleta de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal adicionar 10 mL de metanol y calentar 30 minutos en baño de maría. Filtrar y evaporar hasta 1 mL. Aplicar 20 µL en una cromatoplaque de sílica gel 60 F₂₅₄. Utilizar como estándar canela en metanol al 1 por ciento, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina.).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7); tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 mL de tolueno y 50 mL de éter son mezclados durante 5 min con 50 mL de ácido acético al 10%, se filtra y se descarta la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter es usada).

Detección:

Sin tratamiento químico UV 254nm fluorescencia. UV 365 nm todas las cumarinas muestras una intensa fluorescencia azul o verde- azul.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento. UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

Investigación de cardenólicos y bufadienólicos:

Presencia de lactonas insaturadas: Extraer 10 g de material vegetal con 30 mL de etanol o metanol al 80 por ciento y filtrar. Colocar tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 mL) sobre un papel filtro. Secar y agregar unas gotas del reactivo Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color

(mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 por ciento.

Presencia de azúcares 2-desoxigenadas: Evaporar 10 mL del extracto etanólico o metanólico, eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Secar el residuo y agregar 3 mL de reactivo Keller-Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. Observar la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo).

Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal agregar 20 mL de etanol al 50 por ciento y mantener en reflujo durante 15 minutos. Dejar enfriar y filtrar, el filtrado se trata con ácido acético glacial. Extraer en 3 porciones de 15 mL de diclorometano. Los extractos se filtran sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporan. Disolver con 1 mL de diclorometano/etanol (1:1) y aplicar 30-50 μ L en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar digoxina 5 mg/2 mL de metanol (20 μ L), lanatóside, A,B,C; oleandrin, k-strophantin.

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8), acetato de etilo-metanol-etanol-agua (81:11:4:8).

Detección:

Sin tratamiento químico: Fluorescencia por cardenólidos en UV-265 nm, la mayor fluorescencia es debida a los bufadienólidos. Los glicósidos cardíacos no fluorescen en UV-365 nm.

Detección del anillo lactónico de los cardenólidos: reactivo de Kedde, zonas rosa o azul violeta en vis, los bufadienólidos no reaccionan.

Reactivo de Kedde: 5 mL de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 3% en etanol, mezclado con 5 mL de NaOH 2M.

Investigación de esteroides o triterpenoides:

Reacciones de color:

Liebermann Burchard: Aplicar unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en la que las saponinas triterpenoidales dan color rosado o púrpura.

Resultados (verde, azul verdoso) posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.

Ácido tricloroacético: Se le añade a la muestra unos cristales de ácido tricloroacético.

Resultado: color naranja, rojo, rojo oscuro, triterpenos tetracíclicos y esteroides desarrollan color a 60 °C, triterpenos pentacíclicos a 110 °C.

Carr-Price: 1 mg de muestra en cloroformo se le agrega 2 mL de tricloruro de antimonio al 30% en cloroformo.

Resultado: color azul, posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.

Investigación de saponinas:

Prueba de espuma:

Tubo 1: 100 mg de material vegetal pulverizado y seco.

Tubo 2: 2 mL de control de saponinas (0.5 %).

Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo se le adiciona 10 mL de agua destilada. Calentar en baño de maría (60°C) durante 30 minutos. Enfriar, taponar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 segundos. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos, observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

Cromatografía en capa fina: 2 g de material vegetal seco, se extraen con 10 mL de etanol al 70 por ciento con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5 mL y proceder a aplicar 25-40 µL en una cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 µL). Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40).

Detección:

Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

(Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides).

(Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas). (Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas).

Investigación de principios amargos:

Cromatografía en capa fina: Calentar 1 g de material vegetal con 10 mL de metanol en baño de maría a 60°C por 10 minutos. Evaporar y filtrar a 2 mL. Aplicar en la cromatoplaca. Estándar: artemisina al 1 por ciento en metanol (20 µL).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo-metanol (95:5).

Detección: vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, café-rojas, azules-verdes.

(Reactivo de Liebermann-Buchard: UV-365 nm: gris, café; VIS: café oscuro, gris).

Investigación de taninos:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y evaporar a sequedad. Añadir 25 mL de agua caliente al residuo y agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y filtrar. Adicionar 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10 por ciento).

Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración.

Con cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol; negro-azulado; pirogalol)

Cromatografía en capa fina:

Fase móvil: n-butanol, ácido acético y agua (40:10:50).

Revelador: hexaferriicianuro de potasio $K_3Fe(CN)_6$ /cloruro férrico ó fast blue/NaOH

Investigación de glicósidos cianogénicos:

Prueba de Guignard: Colocar 2 a 5 g de material vegetal pulverizado en un erlenmeyer de 125 mL y humedecer con agua; adicionar 1 mL de cloroformo. Aparte, introducir una tira de papel Whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente secar. La tira de papel húmedo insertarla en el erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar a una distancia de 1 cm de la muestra. Doblar el papel y tapar el erlenmeyer con un corcho. Calentar en baño de maría a 37°C durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo-café).

Investigación de aceites volátiles:

Cromatografía en capa fina:

Método A: Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano agitando por 15 minutos. Filtrar y evaporar en baño maría (60°C) a sequedad.

Disolver en 1 mL de tolueno y aplicar 20-50 μ L en cromatoplaça de silicagel 60 F₂₅₄.

Método B: Pesar 10-50 g (dependiendo del tipo de droga) de material vegetal y destilar con arrastre de vapor por 1 hora. Recolectar el aceite esencial en xileno. Diluir la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y aplicar 5 μ L (1:10) en cromatoplaça de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3 μ L).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, vanillina-ácido sulfúrico. Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

Investigación de Esteroles insaturados:

Ensayo macro y semimicro: Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 por ciento. Filtrar y concentrar a sequedad. Remover pigmentos vegetales con porciones de 10 mL de éter de petróleo hasta que el éter salga incoloro. Adicionar 10 mL de benceno y agitar durante unos minutos. Decantar en un tubo y secar con sulfato de sodio anhidro. Filtrar y evaporar a sequedad. Agregar 10 mL de cloroformo, secar con sulfato de sodio anhidro, filtrar y dividir el filtrado en 3 tubos:

Tubo 1: Agregar 3 gotas de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (Liebermann-Buchard).

Tubo 2: Ensayo de anillo agregar ácido sulfúrico concentrado (Prueba de Salkowski).

Tubo 3: Testigo.

Usar como estándar una solución de colesterol en cloroformo 0.1 por ciento. Observar cambios de colores inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un período de una hora.

Prueba de anillo: En presencia de esteroides insaturados, formación de un anillo rojo cereza en la interfase.

Investigación de Sesquiterpenlactonas:

Prueba de Legal: 1-2 mg de muestra en agua o etanol se le agrega 1 mL de solución fresca de nitroprusiato de sodio 0.5% en agua y 1-4 gotas de KOH 2N. Se presenta colores característicos rojo oscuro, para lactonas α y β insaturada.

Prueba de Baljet:

Preparación de reactivo:

a. 1g de ácido pícrico en etanol al 95%.

b. 10 g de NaOH en 100 mL de agua.

Se mezcla a y b y se añade a la muestra unas gotas del reactivo, se presenta un color rojo claro a oscuro.

Cromatografía en capa fina:

Fase móvil: Cloroformo: éter etílico (5:1), cloroformo: metanol (99:1), éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo (2:2:1)

Detección: Se pueden emplear diferentes reveladores tales como: Vapores de yodo, solución acuosa de permanganato de potasio al 5% , ácido sulfúrico concentrado o al 50%, vainillina al 1% en etanol, luego del calentamiento de la placa por 5 min a 100 –105 °C aparecerán manchas verdes, amarillas, marrones, rojas o azules.

Investigación de Aceites grasos:

Examinar por cromatografía en capa fina, utilizando como sustancia de recubrimiento un gel de sílice

octadecilsililado adecuado para cromatografía en capa fina de alta resolución.

Disolución problema: Salvo indicación contraria, disolver aproximadamente 20 mg (1 gota) del aceite graso en 3 ml de *cloruro de metileno R*.

Disolución de referencia: Disolver aproximadamente 20 mg (1 gota) de *aceite de maíz R* en 3 ml de *cloruro de metileno R*.

Aplicar a la placa, por separado, 1 μ l de cada disolución.

Procedimiento:

- Desarrollar dos veces hasta una distancia de 0,5 cm utilizando *éter R*.
- Desarrollar otras dos veces hasta una distancia de 8 cm utilizando una mezcla de 20 mL de *cloruro de metileno R*, 40 mL de *ácido acético glacial R* y 50 mL de *acetona R*.
- Dejar que la placa se seque al aire y pulverizar con una disolución de 100 g/L de *ácido fosfomolibdico R* en *etanol al 96 por ciento V/V R*.
- Calentar la placa a 120 °C durante aproximadamente 3 min y examinar a la luz del día.

Investigación de valepotriatos:

Extracción: Pesar 0.2 g de material vegetal seco y molido, agregar 5 mL de diclorometano a 60 °C en baño María por 5 minutos. Agitar y filtrar, lavar el residuo con diclorometano, mezclar y evaporar a sequedad. Al residuo agregar 2 mL de acetato de etilo.

Cromatografía en capa fina:

De la solución agregar 10 μ L a la cromatoplaca.

Fases móviles: Tolueno:acetato de etilo (75:25), n-hexano:metiletilcetona (80:20).

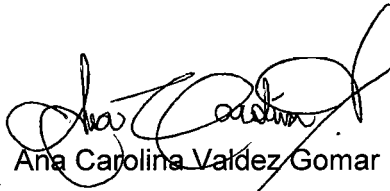
Detección: ácido clorhídrico y ácido acético, luz UV/VIS 254 nm, calentar a 100 °C (zonas azules indican la presencia de valtratos y acevaltratos, zonas cafés indican dihidrovaltratos).

Dinitrofenilhidrazina luz UV/VIS 254 nm (zonas verdes gris o azules, si hay calor excesivo, entonces zonas cafés-amarillas).

Referencias:

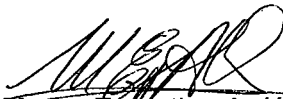
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega. Barcelona. 515 p.
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica*. 2ª. Ed. Fondo Editorial. Perú. 300 p
- *Real Farmacopea Española* (2002) 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 p.
- Sharapin, N. (2000) *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247 p.

- Santa Cruz, L. Manual: Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. 92 p.
- Vila, R & Reing, M. (2003). Métodos de Control de Calidad. Madaus, UB Virtual, Imicromat. 39 p
- Wagner, H. *et al.* (1984). Plant Drug Analysis. Berlin, Springer-Verlang, 320 p
- WHO (1998) Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO. 115 p.



Ana Carolina Valdez Gomar

AUTORA



MSc. María Ernestina Ardón Quezada

DIRECTORA



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

DECANO

