

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN – LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE FARMACIA



“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE:

LICENCIADO QUIMICO FARMACEUTICO

Evaluación Cualitativa-cuantitativa de 10-gingiol por HPLC TLC en matriz vegetal y producto terminado durante el periodo febrero-agosto 2013

AUTOR:

✚ Br. GABRIELA LUCIA MENDOZA ULLOA

Tutor: Lic. Kelvin Núñez

Asesor: Lic. Cesar Peralta

León, Nicaragua, Diciembre 2013.



DEDICATORIA

Primeramente a **Dios** por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud, ser el manantial de vida y darme lo necesario para seguir adelante día a día para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis **Padres** por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi **Hermana** por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí aciertos y de momentos difíciles y a todos aquellos que ayudaron directa o indirectamente a realizar este documento.

A mi **Hijo** por ser mi inspiración y mi mayor motivo de superación.

A mis **Tutores** por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales, por su apoyo ofrecido en este trabajo, por haberme transmitido los conocimientos obtenidos y haberme llevado paso a paso en el aprendizaje.

Gabriela



AGRADECIMIENTO

A **Dios** por ser mi guía y luz en el camino y darme una familia incondicional donde me enseñaron a luchar por cumplir mis metas y objetivos a pesar de las dificultades de la vida.

A mis **Padres** que se sacrificaron por mí, brindándome la oportunidad de estudiar, quienes confiaron y nunca se desanimaron de que algún día pueda culminar mis estudios y ser una gran profesional.

A mis **Maestros** que fueron el pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo y que con su profesionalismo y enseñanzas contribuyeron a nuestra formación profesional.

Gabriela



INDICE

Contenido	Paginas
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
MARCO TEORICO.....	5
MATERIAL Y METODO.....	32
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	36
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	51
ANEXOS.....	54





INTRODUCCION



Las exigencias para establecer la calidad de productos de origen natural de acuerdo a requisitos internacionales RTCA 11.03.56.09 (Verificación de la calidad de Productos de Origen natural) justifica la necesidad de establecer métodos analíticos confiables de acuerdo a las capacidades de los fabricantes , de lo anterior se plantea que existen métodos analíticos para la determinación de componentes activos en extractos de jengibre pero su determinación requieren necesidades instrumentales, confiables, accesibles y de rápida respuesta que garanticen resultados fiables de acuerdo a requerimientos de autoridades reguladoras para la industria que elabora fitofármacos .

El presente trabajo de investigación pretendo ser una muestra de los ensayos posibles para la verificación de la calidad de productos naturales de consumo humano utilizando la combinación de técnicas analíticas instrumentales cuantitativas como HPLC ,la cual permite cuantificación fiable de 10-gingerol con buena resolución y separación de 10-gingerol de otros componentes de jengibre y cualitativas como TLC para la verificación de contenido de componentes activos del producto en estudio y demostrar así que la verificación de calidad de dichos productos de manera analítica de alto nivel puede ser una realidad y no una utopía.

Se evidencia en los cromatogramas obtenidos de HPLC y Rf de TLC Cuali-cuantitativamente, los métodos ensayados, apto para ser validado y demostrar la confiabilidad del mismo.



OBJETIVOS



General:

1. Evaluación Cualitativa-cuantitativa de 10-gingirol por métodos analíticos y cualitativos HPLC TLC en matriz vegetal y producto terminado.

Específicos:

1. Comparar la eficiencia del método de extracción en metanol y tolueno para la matriz de ensayo (rizoma de *Zingiber officinalis*).
2. Evaluar el contenido de 10-gingirol por cromatografía líquida de alta resolución HPLC en matriz vegetal (rizoma de *Zingiber officinalis*) y producto terminado (Jarabe de jengibre).
3. Evaluar el contenido de 10-gingirol por cromatografía plana TLC en matriz vegetal (rizoma de *Zingiber officinalis*) y producto terminado (Jarabe de jengibre).



MARCO TEORICO



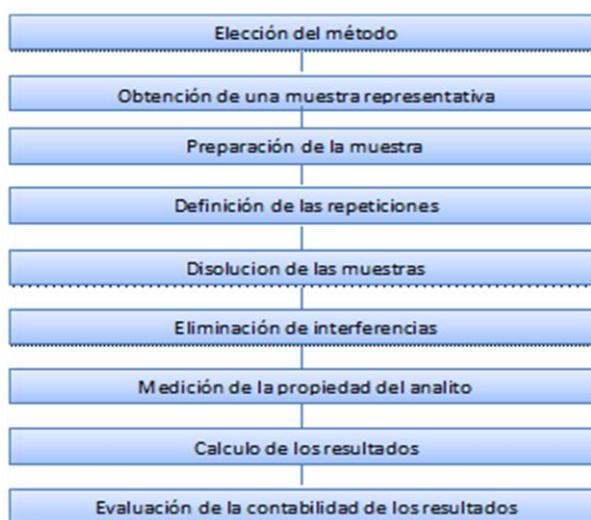
1. Desarrollo De Métodos Analíticos

La química analítica comprende la separación, identificación y determinación de las cantidades relativas de los compuestos que forman una muestra. El análisis cualitativo nos muestra la presencia o ausencia de los analitos o sustancias a analizar, mientras el análisis cuantitativo nos indica la cantidad de unos o más analitos. En general se requiere una separación de fracciones para obtener la muestra adecuada para el análisis. (1)

1.1 Etapas de un método analítico

En el diagrama siguiente se ilustran las etapas o pasos en el desarrollo de un método analítico cuantitativo (1):

Figura N°1.



2. Plantas medicinales, extractos y especialidades fitoterapéuticas (2)

Las plantas medicinales son productos vegetales de origen natural y de composición variable no totalmente definida. Es decir, son seres vivos que varían constantemente su composición. En el transcurso de la vida de una determinada planta, dependiendo de la naturaleza, del tiempo de insolación, de la cantidad y calidad del agua de riego, de las características del suelo, de la época de recolección, etc., su composición química varía cualitativamente y cuantitativamente. Además, las distintas partes de una misma planta (hojas, raíces, etc.) también tienen distinta composición.

Por todo ello resulta bastante utópico suponer que se conoce la composición química exacta de todos y cada uno de los componentes de una planta. No obstante gracias a recientes estudios exhaustivos se ha logrado determinar la composición química de mucho de ellos.



2.1 **Ámbito de aplicación y características de las plantas medicinales**

Según la EMEA (agencia europea del medicamento) cuando se habla de plantas medicinales se refiere a:

- ✓ Planta medicinal propiamente dicha (materia prima)
- ✓ Preparados a base de plantas medicinales, como son extractos, infusiones, etc.
- ✓ Especialidades farmacéuticas elaboradas con plantas medicinales o con preparados de estas.

La composición química y la calidad de la planta medicinal como materia prima son un factor determinante para la composición y la calidad final de sus preparados y especialidades farmacéuticas. Por ello, es fundamental el control de calidad de la planta medicinal (materia prima).

Frecuentemente se desconoce con exactitud que principios activos (generalmente más de uno) son los responsables de la acción terapéutica. En estos casos se elige la determinación de un “marcador de calidad”. Es decir un analito presuntamente estable que está presente en la planta aunque no necesariamente deba tener una actividad terapéutica definida.

También ocurre que al no existir patrón de referencia en el mercado o ser de muy difícil localización se estipule el control de calidad de una materia prima mediante la valoración de un conjunto de sustancias químicas con el mismo grupo funcional intrínsecamente comporta una falta de selectividad especificaciones de calidad de muchas plantas medicinales, desde el punto de vista de materias primas, en distintas monografías presentes en farmacopeas.

Los analitos presentes en las placas medicinales se hallan en el interior de su estructura y no de forma aislada como sucede en una mezcla de analitos y excipientes, por lo que deben ser extraídos de su interior. La principal dificultad de extracción del analito no radica en el tratamiento del preparado a base de plantas medicinales, sino en el de la propia materia prima. A causa de esta característica, a menudo deben aplicarse tratamientos de muestra largos y agresivos, lo que puede provocar pérdidas importantes de analito. Todo ello hace que los porcentajes de recuperación sean generalmente bajos.

En las plantas medicinales no se pueden aplicar el concepto de matriz entendido como el conjunto de todos los componentes exceptuando el analito, ya que es imposible separar el propio analito (principio activo o marcador) del resto de componentes. Es decir por ello que el término matriz se utiliza como sinónimo de muestra representativa.



Una dificultad adicional en los estudios de validación de métodos analíticos de plantas medicinales radica en la falta de homogeneidad y representatividad de la muestra. Las distintas partes de una misma planta tienen una composición química diferente, que además se ve modificada según la época de recolección, el corte y las condiciones de almacenamiento. Por tanto es primordial efectuar un muestreo adecuado y homogeneizar la muestra a analizar al objetivo de conseguir la máxima representatividad. Aun cuando se utilizan extractos normalizados de plantas medicinales que han pasado por una fase previa de homogeneización (ej. Estado líquido), continúa persistiendo la incertidumbre sobre si su composición química es realmente homogénea.

Dado que el estudio de calidad de los preparados a base de plantas medicinales como materia prima, se considera lógico e interesante intentar aplicar los mismos métodos analíticos (utilizados en la identificación y valoración de analitos) al control de calidad de los productos finales preparados con la misma planta. Con ello se consigue una correlación en las especificaciones de materia prima y producto acabado que favorecerá el seguimiento y la comprobación de un adecuado y constante método de fabricación de los productos elaborados.

4. Situación actual y tendencias del control de calidad de las plantas medicinales.⁽³⁾

El creciente interés en el uso de plantas medicinales está dando lugar a un mercado de rápido crecimiento para los productos fitoterapéuticos, suplementos dietéticos y alimentos funcionales. Esta importante expansión en el uso de plantas medicinales plantea muchas inquietudes acerca de su control de calidad, ya que podría dar lugar a la recolección masiva y sin supervisión, sin ninguna consideración de la calidad de las plantas usadas como materias primas. La seguridad en el consumo de un producto fitoterapéutico debe ser garantizada por un proceso completo de control de calidad. Este debe ser un proceso estandarizado, detallado, conciso y reproducible que pueda ser utilizado para evaluar a otros productos de la misma naturaleza. El aseguramiento de calidad de productos fitoterapéuticos, es un prerrequisito para realizar ensayos clínicos con resultados reproducibles y es necesario con el fin de identificar adulteraciones, falsificaciones o confusiones entre plantas.



Una gran parte de los productos fitoterapéuticos son clasificados como suplementos dietéticos, por lo que no están sujetos a los mismos procesos de monitorización de los medicamentos; es por ello que en Estados Unidos, la FDA (Food and Drug Administration) emitió la guía DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act of 1994) para la regulación de este tipo de productos. La guía permite a las compañías hacer afirmaciones sobre los beneficios de sus productos en la conservación de la salud. Sin embargo, no revisa que se cumplan los estándares de control de calidad en cuanto a seguridad, eficacia y pureza.

La OMS, en su manual de métodos de control de calidad para plantas medicinales, la FDA y las Farmacopeas de diversos países presentan una colección de procedimientos recomendados para evaluar la identidad, pureza y contenido de los materiales de plantas medicinales; con estos procedimientos intentan proporcionar a los laboratorios una herramienta para llevar a cabo el control de calidad de los productos fitoterapéuticos. Los parámetros que incluyen estas referencias para describir la calidad de los productos a base de plantas usados como medicamentos son: a) pruebas de identidad, donde consideran las características macroscópicas, microscópicas y organolépticas, así como el perfil obtenido por cromatografía en capa fina; b) pruebas de pureza para determinar humedad, cenizas, materia extraña, disolventes, la presencia de contaminantes microbianos, metales pesados y residuos de plaguicidas; y c) la valoración de principios activos y/o marcadores.

La mayoría de las plantas medicinales han sido autenticadas tradicionalmente por medios morfológicos e histológicos. Sin embargo, este enfoque puede no ser fiable porque las plantas de la misma familia son morfológicamente similares y los productos comerciales elaborados con plantas se preparan de diversas maneras que hacen más difícil su identificación a través de una inspección sensorial. Actualmente, es una práctica común entre los analistas de productos naturales la selección de uno o más compuestos como marcadores para la identificación y evaluación de la calidad. Sin embargo, es reconocido que este tipo de determinaciones no proporciona por sí una idea completa de un producto farmacéutico a base de plantas, ya que son múltiples los constituyentes responsables de sus efectos terapéuticos y a veces la selección de marcadores adecuados es difícil y subjetiva.



Estos constituyentes pueden trabajar sinérgicamente y pueden variar dependiendo no únicamente de la especie, sino también de las condiciones de crecimiento, de la época de cosecha, del origen, de los métodos de proceso y secado y del tiempo de almacenaje, entre otros factores. Por otra parte, algunos productores sin escrúpulos continuamente están tratando de desarrollar maneras de hacer el perfil químico de sus productos similar al perfil auténtico presentado por la planta medicinal en cuestión. En estas circunstancias específicas, el uso de compuestos marcadores es incapaz de confirmar la identidad de una planta.

Es por estas razones que se hace necesario determinar la mayoría de los constituyentes de las plantas medicinales con el propósito de asegurar la confiabilidad y precisión de las investigaciones farmacológicas y clínicas, para conocer su bioactividad y los posibles efectos colaterales de los compuestos activos, así como mejorar el control de calidad de sus productos.

El establecimiento de huellas dactilares para las plantas medicinales es un enfoque relativamente reciente adoptado por los investigadores para hacer frente a la complejidad química de los productos fitoterapéuticos y los problemas relacionados con el uso de pocos compuestos marcadores. La huella dactilar de una planta medicinal podría ser un espectro o un cromatograma obtenido por un procedimiento definido para caracterizar la composición química de una muestra; se supone que es una característica única para la identificación de las plantas, extractos de plantas o preparados en cuestión. Así pues, el perfil cromatográfico o el perfil espectroscópico de la planta medicinal, parece ser la herramienta más conveniente para llevar a cabo el control de calidad de los productos de uso farmacéutico a base de plantas. Normativas actualizadas sobre plantas medicinales publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia de Medicinas y Alimentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administración, FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) se pronuncian por el uso de las huellas dactilares; indican que la identificación de la planta medicinal debe ser una de las primeras pruebas aplicadas para garantizar la calidad y para discriminar entre especies relacionadas o muestras adulteradas.

5. Desafíos en el control de calidad de las plantas medicinales ⁽³⁾

La huella dactilar debe proporcionar las atribuciones fundamentales de integridad y semejanzas o diferencias para representar químicamente el producto fitoterapéutico investigado, permitiendo autenticar el material vegetal.



Las huellas dactilares han de ser capaces de demostrar las semejanzas y diferencias entre varias muestras de una planta medicinal en particular, incluso si el número y/o la concentración de los componentes químicamente característicos no son exactamente iguales entre ellas, de tal manera que, al analizar la huella dactilar de una planta medicinal, se consideran los múltiples constituyentes y no solamente uno o dos marcadores durante el proceso de evaluación de la calidad de estos productos. Sin embargo, en cualquier producto herbal existen cientos de componentes desconocidos y muchos de ellos se encuentran en baja concentración. Además, normalmente existen variabilidades entre muestras de la misma planta medicinal; en consecuencia, obtener huellas dactilares confiables que representen componentes químicamente característicos de un producto fitoterapéutico no es tarea fácil. Por ello, en el desarrollo de métodos para el análisis de plantas medicinales aparecen una serie de desafíos:

- El análisis de marcadores o componentes activos en una matriz compleja y algunas veces desconocida.
- Los analitos buscados pueden tener problemas en su extracción con disolventes o ser térmicamente lábiles.
- La falta de sustancias químicas de referencia y/o materiales de referencia certificados.
- La selección adecuada del método de extracción.
- La variación en la composición de la planta obtenida entre lote y lote.

Además, la seguridad, eficacia y calidad de productos finales a base de plantas medicinales dependen de la calidad de las materias primas y de cómo se manejan a través de procesos de producción.

6. Procedimientos analíticos empleados en el control de calidad de las plantas medicinales.⁽³⁾

En general, los métodos de control de calidad de las plantas medicinales deberían incluir, además de la inspección sensorial, ensayos analíticos tales como la cromatografía en capa fina, la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alta resolución, espectros de infrarrojo medio y análisis mediante otras espectrometrías diversas, como el infrarrojo cercano o resonancia magnética nuclear. En la presente memoria se han utilizado las técnicas de la espectroscopia de infrarrojo cercano y de la cromatografía de líquidos de alta resolución y se hace énfasis en sus aplicaciones para el control de calidad de las plantas medicinales.



5.1 Procedimientos de extracción. (3)

El método de extracción y preparación de muestra es muy importante para obtener buenos resultados, ya que si se quiere tener una buena información del perfil de una planta medicinal es necesario contar con un método que extraiga la mayoría de los componentes activos de las plantas, que garantice la integridad de la actividad farmacológica y, a la vez, que sea un método preciso y ofrezca buenas recuperaciones. En los productos fitoterapéuticos, los compuestos de interés suelen presentar grandes diferencias en cuanto a polaridad y termo estabilidad. Por ello, aún con una misma técnica de extracción las condiciones de trabajo (solvente, temperatura, etc.) pueden variar de un material vegetal a otro, lo que hace indispensable evaluar cuidadosamente la eficiencia del método empleado. El calentamiento con reflujo y la extracción soxhlet se encuentran entre los métodos más empleados para productos naturales. Sin embargo, este tipo de métodos son lentos, requieren grandes cantidades de solventes y pueden tener eficiencias de extracción bajas.

En la última década, se han desarrollado técnicas como la micro extracción en fase sólida (SPME) o la micro extracción en fase líquida (LPME) cuyas principales ventajas son la disminución en el consumo de disolventes y en los tiempos de análisis, su relativo bajo costo, su simplicidad y en muchos casos la posibilidad de obtener factores de enriquecimiento mayores. La SPME fue introducida en los años 90 y se ha convertido en una técnica muy utilizada para la preparación de muestras para cromatografía de gases y en menor medida para cromatografía líquida. En el análisis de productos fitoterapéuticos esta técnica ha sido empleada principalmente para caracterizar compuestos volátiles.

5.2 Técnicas instrumentales empleadas con los productos fitoterapéuticos. (3)

Con respecto a las técnicas de análisis de las plantas medicinales, las cromatográficas tienen una muy poderosa capacidad de separación para los complejos componentes químicos de los extractos, siendo posible separarlos en muchas sub- fracciones relativamente simples. La cromatografía de capa fina (CCF) ha sido la técnica de elección para el análisis de plantas medicinales y es aún usada con mucha frecuencia. Con las limitaciones habituales de la técnica, la CCF es usada como un método de rastreo y semicuantitativo que provee perfiles cromatográficos característicos y permite identificar adulteraciones en los productos.



Las principales ventajas de esta técnica es que es sencilla, rápida, versátil y permite analizar muchas muestras a la vez. No obstante, su aplicación regularmente se limita a la identificación de compuestos marcadores, con las desventajas que ello conlleva.

Es bien conocido que muchos de los principios farmacológicamente activos en las plantas medicinales son compuestos volátiles, por lo que su estudio es de gran importancia en el análisis de medicinas tradicionales a base de plantas. La cromatografía de gases (CG) ha sido empleada en el análisis de compuestos volátiles de las plantas medicinales con propósitos de establecer perfiles de identificación de las mismas, ya que la composición y concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles (aceites) son característicos de algunas plantas. Cambios en la composición de aceites volátiles pueden indicar adulteraciones o cambios enzimáticos de oxidación o fermentación. El empleo de acoplamiento por espectrometría de masas (CG-EM) para establecer perfiles cromatográficos de plantas ha sido empleado por varios autores. El establecimiento de estos perfiles se realiza mediante comparación de los tiempos de retención y los espectros de masas de los componentes comunes en los especímenes. La CG-EM tiene la ventaja de que proporciona, además, información de identidad de los compuestos. La principal desventaja de la CG es que no puede ser empleada para análisis de compuestos polares y no volátiles, a menos que se realice una derivatización previa de la muestra.

La electroforesis capilar (EC) fue introducida a principios de los 80 como una poderosa técnica analítica de separación que ha sido desarrollada rápidamente. Los métodos electroforéticos, especialmente la EC, han sido empleados en el análisis de plantas medicinales en la última década. La EC permite la separación y análisis de los ingredientes activos en las plantas medicinales; tiene la ventaja de que requiere poca cantidad de muestra y permite realizar análisis rápidamente con muy buena capacidad de separación. También es una buena herramienta para la generación de huellas dactilares de las plantas medicinales. Estudios recientes de alcaloides y flavonoides en plantas medicinales han empleado la EC.

5.3 Espectroscopia en el infrarrojo cercano. (3)

La región del infrarrojo cercano (NIR), se extiende entre 800 y 2500 nm o, expresado en número de onda, de 12 500 a 4000 cm^{-1} . Es la primera región espectral que muestra bandas de absorción relacionadas con las vibraciones moleculares y se caracteriza por las bandas armónicas y las bandas de combinación. Esta región se utiliza ampliamente para el análisis de la composición de diversos productos, incluyendo los alimenticios.



La espectroscopia NIR recoge la información de las estructuras químicas, a través de la valoración de los enlaces moleculares reflejados en el espectro obtenido (p. ej. C-H, N-H and O-H, que son los principales componentes estructurales de las moléculas orgánicas). La composición química de la muestra origina diferencias que quedan reflejadas en las vibraciones armónicas y de combinación, construyendo de esta manera un espectro característico que sirve como huella dactilar. La relación entre la huella dactilar y la composición química de la muestra puede parecer poco evidente pero el hecho es que, aplicando el mismo procedimiento experimental, el espectro obtenido puede considerarse como una característica determinada únicamente por los componentes químicos presentes en la planta medicinal y en estas circunstancias es aplicable el concepto de Fito equivalencia, ya que este no exige el aislamiento e identificación de los componentes de la muestra.

5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). (3)

La CLAR es un método popular empleado en el análisis de plantas medicinales debido a que es una técnica relativamente sencilla y muy versátil, ya que permite analizar compuestos tanto volátiles como no volátiles, polares, no polares y hasta iónicos. En general, la CLAR puede ser empleada para analizar la mayoría de los compuestos en las plantas medicinales, tal y como lo revelan las publicaciones a este respecto. Entre los métodos cromatográficos para la toma de huellas dactilares de las plantas medicinales, el más popular sigue siendo la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de diodos (CLAR-DAD). El uso de detectores de diodos en línea proporciona información adicional a los perfiles cromatográficos obtenidos a longitudes de onda simples, ya que se pueden obtener además los espectros relacionados con cada uno de los picos, lo cual puede ser empleado como criterio de identificación y análisis de pureza de cada uno de los picos.

Otros acoplamientos, tales como: CLAR-EM, CLAR-RMN, también han sido utilizados con estos mismos propósitos; en particular, los acoplamientos CLAR-EM se han convertido en una herramienta ampliamente utilizada en el análisis de productos fitoterapéuticos ya que proporcionan también información espectral adicional, que es muy útil para el análisis cualitativo y para la elucidación estructural. Aunque tradicionalmente este tipo de acoplamientos han sido utilizados para la identificación de compuestos específicos, en la actualidad existe un interés creciente en su aplicación a la obtención de la huella dactilar del producto completo.



7. Quimiometría ⁽³⁾

Se pueden emplear muchas técnicas cromatográficas y espectroscópicas, incluyendo técnicas con acoplamientos, para el análisis de los productos fitoterapéuticos y para construir los perfiles típicos de éstos. El problema es cómo se evalúa la información obtenida con estas técnicas.

La quimiometría es un campo interdisciplinario que involucra el análisis multivariable, los modelos matemáticos, la informática y la química analítica. Algunas de las áreas de aplicación más importantes de la quimiometría incluyen (1) la calibración, validación y pruebas de significación, (2) la optimización de las mediciones químicas y procedimientos experimentales y (3) la extracción del máximo de información química a partir de datos analíticos. El perfil cromatográfico o espectroscópico de una planta medicinal es un sistema multivariable, tanto por la manera en que los instrumentos actuales realizan el registro de las señales analíticas, como porque se involucra en el perfil a la mayoría de los componentes fitoquímicos de la planta medicinal. Con ayuda de la quimiometría se puede afrontar, con mayores posibilidades de éxito, las dificultades que surgen al emplear técnicas cromatográficas o espectroscópicas para el control de calidad de las plantas medicinales, como son las señales no resueltas, la gran cantidad de componentes en las plantas y la complejidad de los espectros del infrarrojo cercano.

La quimiometría abarca diversos objetivos como la aplicación de pre tratamientos a los datos experimentales para mejorar la calidad de la señal, la construcción de modelos para el reconocimiento de pautas y la determinación cuantitativa.

7. Aplicaciones de la cromatografía ⁽⁴⁾

7.1 Análisis Cualitativo

Un análisis cromatográfico puede dar una amplia información cualitativa si se escoge el sistema de detección adecuado para determinar y evaluar los analitos separados, así si se utiliza un detector que permita obtener un espectro de cada compuesto separado y a su vez contenga una base de datos que pueda realizar su comparación con una biblioteca de espectros se podría, de una forma muy precisa, establecer la identidad de los componentes de una muestra, de hecho esto se logra fácilmente con cromatógrafos que contienen sistema de detección como el Infrarrojo (IR), el de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o el espectrómetro de Masas (MS).



Sin embargo, estos sistemas son muy costosos, es por ello que la mayoría de los laboratorios cuentan con cromatografos con sistemas de detección sencillos como el detector de ionización a la llama (siglas en inglés, FID) o el detector de conductividad térmica (siglas en inglés (TCD) en el caso de cromatografía de gases o detectores de absorbancia o índice de refracción para los casos de cromatografía de líquidos. La única información cualitativa que pueden ofrecer estos sistemas es el tiempo de retención del analito, el cual, solo puede ser usada controlando bien las condiciones cromatográficas como: flujo, temperatura, tipo de fase estacionaria en el caso de gases o composición química de la fase móvil además de las otras variables mencionadas anteriormente para el caso de cromatografía de líquida, además de que se debe tener conocimiento de los posibles compuestos de la muestra y una amplia variedad de patrones para realizar comparaciones. Sin embargo, se puede dar el caso que dos compuestos tengan el mismo tiempo de retención, lo que imposibilita su identificación. Por supuesto que, a partir de cromatogramas obtenidos con diferentes fases móviles (para cromatografía líquida) y estacionarias y a diversas temperaturas de elusión (para cromatografía gaseosa), se puede obtener datos adicionales.

7.2 Análisis Cuantitativo

El uso de la cromatografía se ha extendido en todo el mundo, en las últimas cuatro décadas, no solo por su capacidad de separar compuestos sino porque se puede realizar un análisis cuantitativo de las especies proporcionadas. En la cromatografía en columna, el análisis cuantitativo se basa en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas. El uso de uno u otro termino dependerá de las características de la banda obtenida, aunque en la actualidad con el uso de sistemas de integración de área computarizados, la precisión es muy alta para el cálculo de área, sin embargo siempre es importante conocer las otras herramientas a utilizar para calcular el área de una banda y en qué momento es mejor usar altura en vez de área por si llega a faltar el sistema computarizado.

Para lograr un análisis cuantitativo de los componentes separados de una muestra existe una gran variedad de métodos de análisis entre los que se pueden mencionar:

1. Calibración absoluta
2. Método del estándar interno.
3. Normalización de área (con y sin factor de respuesta)



8. Técnicas Cromatográficas ⁽⁵⁾

8.1 Cromatografía En Capa Fina

Hasta 1987, la principal utilización de la cromatografía en capa fina era básicamente cualitativa o semi-preparativa. El desarrollo de los densitómetros modernos permitió la utilización de esta técnica para los análisis cuantitativos.

El densitómetro mide el área y la intensidad de las manchas de un cromatograma en capa fina presentando registros en forma de picos.

La lectura de una placa puede ser llevada a cabo por transmitancia o reflectancia en la región ultravioleta y visible o por fluorescencia. Para cuantificar una sustancia utilizando esta técnica es necesario primero construir una curva de calibración de concentraciones conocidas de un patrón de la sustancia que va a ser analizada. Sustancias incoloras pueden ser cuantificadas, siempre y cuando se utilicen reactivos cromogénicos, los cuales van a permitir la lectura en el densitómetro. En este caso deben tenerse precauciones pues pueden presentarse una distribución desigual de la coloración, dependiendo de la cantidad y de la forma de aplicación del revelador utilizado, de la cantidad y de la forma de aplicación del revelador utilizado, de la temperatura utilizada durante el calentamiento que puede volatilizar la muestra y del tiempo empleado entre el revelado y la lectura de la placa. La presencia de manchas difusas e irregulares puede presentarse cuando se aplican sustancias en baja concentración que necesitan de la aplicación de un volumen mayor de la solución que va a ser analizada. Estos factores pueden afectar la eficiencia de esta técnica. Existen otros factores que pueden ocasionar errores en la lectura y están relacionados con la falta de reproducibilidad de la aplicación de la muestra y con variaciones de las condiciones cromatográficas. Entre estos factores podemos citar: la homogeneidad del adsorbente empleado o la migración del solvente de forma irregular.

8.1.2 Utilización de la Cromatografía en Capa Fina para el análisis de productos Fito terapéuticos. ⁽⁵⁾

Para obtener un producto fitoterapéutico estandarizado y de calidad debe asegurarse la uniformidad de todos los lotes de su producción. Para lograr este objetivo es indispensable que cada etapa del proceso de producción sea rígidamente realizada. Factores como el origen del material vegetal, la época en que fue realizada la recolección, el proceso de secado y almacenamiento son de una importancia crucial para garantizar un producto final de buena calidad.



La cromatografía en capa fina es una técnica importante en todo el proceso ya que permite proporcionar informaciones sobre la homogeneidad de los componentes químicos del producto y así garantizar que las sustancias responsables de la actividad farmacológica estén presentes en los niveles adecuados.

El primer paso a seguir en el control de calidad de un producto fitoterapéutico es definir cuales grupos de sustancias pueden estar presentes, para de esta manera lograr la identificación de la planta (marcadores) y de aquellas sustancias capaces de ejercer las actividades farmacológicas (principios activos).

El primer paso para realizar el análisis de un determinado producto fitoterapéutico, es definir las sustancias químicas que van a ser investigadas, lo que permitirá identificar cual será el mejor solvente para extraer estas sustancias, así como, determinar el mejor sistema de eluyentes para la migración en la cromatoplaca e incluso identificar los reveladores más adecuados que serán utilizados para detectar las sustancias presentes. Estas sustancias son las llamadas marcadores y los marcadores ideales son los propios principios activos. No siempre en el análisis se hace posible la utilización de los principios activos debido a los siguientes factores:

- ✓ Desconocimiento de las sustancias responsables de la actividad de la planta.
- ✓ Los principios activos son difíciles de detectar o están presentes en pequeñas cantidades en la planta (*catharanthusroseus* contiene vincristina y vinblastina solamente en una proporción de 0.005 %).

En estos casos es imposible utilizar los principios activos como marcadores, siendo necesario seleccionar otras sustancias que caracterizan sin duda alguna a la droga.

El análisis será llevado a cabo comparando determinado producto fitoterapéutico con una sustancia estandarizada definida de antemano como marcadora. En algunos casos la sola comparación con el patrón no es suficiente, por esta razón es necesario que además de ser comparada con la sustancia marcadora sea comparada también con un extracto auténtico revela no solamente la presencia de los principios activos sino también la proporción entre estos y otras sustancias presentes en el extracto.

No siempre se conoce la constitución química de la planta; cuando esto sucede es indispensable realizar su perfil cromatográfico; el extracto, en condiciones definidas de análisis, formara un diseño característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes, llamado huella digital (finger print) de la planta.



La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente manteniendo sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. (6) La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. (6)

8.1.3. Ventajas de la cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el utillaje que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirán el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.(6)

8.1.4. Adsorbentes

Al realizar la elección del adsorbente se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas del adsorbente, cuanto más finamente dividido este mayor será su adhesión al soporte, aunque también se le puede añadir un adherente (yeso).

Algunos de los adsorbentes más utilizados son (6):

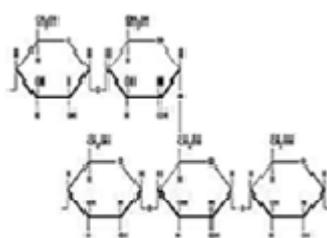


Figura N. 2 Almidon (7)

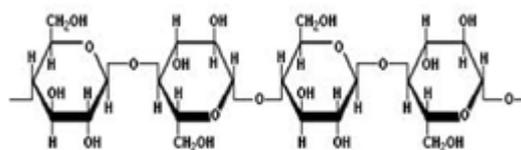


Figura N. 3 Celulosa (8)

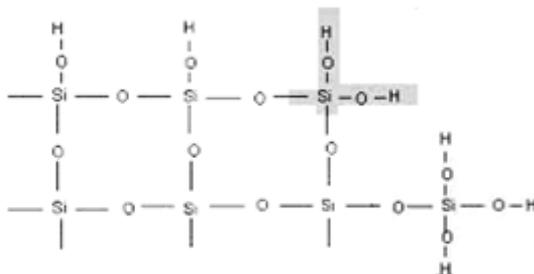


Figura N. 4 Silica gel (9)

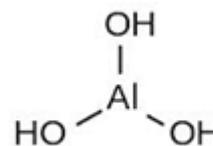


Figura N.5 Oxido de Aluminio (10)

8.1.5 Elección del eluyente

La elección del eluyente dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo. Principales eluyentes en orden creciente de polaridad (6):

- ✓ Éter de petróleo.....(CH₃)₃COCH₃
- ✓ Éterdielico.....C₄H₁₀O, CH₃-CH₂-O-CH₂-CH₃
- ✓ Ciclo hexano.....C₆H₁₂
- ✓ Acetato de etilo.....CH₃-COO-CH₂-CH₃.
- ✓ Tetracloruro de carbono.....CCl₄
- ✓ Benceno.....C₆H₆
- ✓ Etanol.....C₂H₆O
- ✓ Cloroformo.....CHCl₃
- ✓ Metanol.....CH₃OH
- ✓ Diclorometano.CH₂Cl₂
- ✓ Agua.....H₂O
- ✓ Ácido acético.....CH₃-COOH (C₂H₄O₂)

En la elección del eluyente influyen varios factores (6):

- ✓ Pureza
- ✓ No utilizar mezclas de eluyentes (reproducibilidad).
- ✓ No utilizar compuestos.

8.1.6 Desarrollo de la cromatografía

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente, esto es, al permitir que un eluyente ascienda por una placa casi en vertical, por la acción de capilaridad. La cromatografía se realiza en una cubeta. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmosfera de la cámara, las paredes se tapizan con papel impregnado del eluyente. A veces pueden obtenerse separaciones mejores sin poner papeles en las paredes, cosa que no debe olvidarse (6).

Generalmente el eluyente se introduce en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la saturación de la atmosfera. El tiempo de desarrollo, por lo general, no llega a los 30 minutos.



El tiempo de una cromatografía cualitativa suele ser de un par de minutos, mientras que el tiempo de una cromatografía preparativa puede llegar a un par de horas (6).

Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado, o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen. Esto se hace para estandarizar los valores de R_f. Frecuentemente esta distancia es de 10 cm; parece ser la más conveniente para medir valores de R_f. Después del desarrollo, las placas pueden secarse rápidamente con una corriente de aire caliente (6).

La mejor posición de desarrollo para un componente es el punto medio entre el origen y el frente del eluyente, ya que permite separar las impurezas que se desplazan con mayor y menor velocidad. El frente del eluyente nunca debe llegar a tocar el borde de la placa (6)

Si la placa se estropea por acción del aire o de la luz, se sacara en una cámara que contenga un gas inerte o aislado de la luz (6).

8.1.7 Constante R_f y R_x

La contante RF (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente. Se define como (6):

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10(6)

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Figura N.6 Ecuacion de R_f

Para que los RF sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de RF que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un RF entre 0.65 y 0.7. (6)

8.2 Cromatografía líquida de alta resolución (11)

8.2.1 Generalidades

La cromatografía es una técnica que permite separar los diferentes componentes de una mezcla compleja. La separación se logra por diferencias en la movilidad relativa de los solutos, lo cual se logra por las distintas interacciones físicas y químicas entre los componentes de la cromatografía



Componentes Básicos de una Cromatografía:

- ✓ Fase estacionaria
- ✓ Fase móvil
- ✓ Solute o muestra

8.2.2 Clasificación

8.2.2.1 Se aplican varios criterios

- ✓ De acuerdo al soporte
- ✓ Al tipo de equilibrio que se establece en la separación
- ✓ Al estado de agregación de la fase móvil

8.2.2.1. a. Según el soporte.

la cromatografía plana tiene las ventajas de ser una de las más sencillas, rápidas y de bajo costo sin embargo solo se aplican con fines analíticos, tienen poca eficiencia en la separación y no se adaptan a sistemas automatizados.

Las cromatografías en columna tiene la característica de ser más versátiles, a diferencia de la cromatografía plana esta si se adapta a un sistema automatizado y poseen una mayor resolución y capacidad de carga; poseen las desventajas de tener un alto costo inicial, necesidad de equipamiento y requieren de un personal capacitado para su aplicación.

8.2.3 Clasificación.

- ✓ Cromatografía de reparto: El soluto está en equilibrio entre el líquido de la fase móvil y el de la fase estacionaria por diferencias de solubilidades.
- ✓ Cromatografía de adsorción: Fenómeno superficial en el cual las partículas del soluto son adsorbidas por la fase estacionaria.
- ✓ Cromatografía de intercambio iónico: Los iones del soluto son retenidos por los grupos funcionales que se encuentran en la fase estacionaria.
- ✓ Cromatografía de exclusión molecular: No hay equilibrio de separación. Se separan por el tamaño partículas.
- ✓ Cromatografía de afinidad: reacción inmunológica donde el soluto es el antígeno y los anticuerpos se encuentran adsorbidos en la fase estacionaria.

8.2.4 Parámetros a Considerar en Cromatografía

t_R Tiempo de retención: tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el soluto alcanza el detector(a veces esta magnitud se mide en volumen de elución.



t_m Tiempo muerto: es el tiempo necesario para que especie que no se retiene en la fase estacionaria alcance el detector.

W Ancho del pico en la base: es el tiempo transcurrido desde que el soluto alcanza el detector hasta que lo abandona.

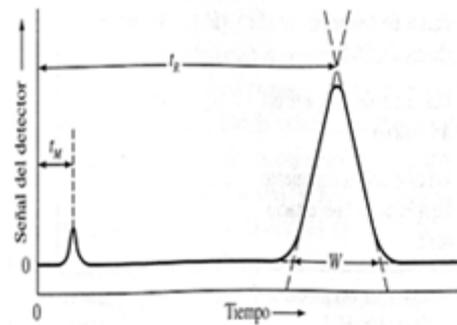


Figura N.7

K_c Constante de distribución: Valor teórico que relaciona la concentración de un soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

K Factor de retención: $K_c = \frac{C_s}{C_m}$ factor que se puede determinar permite comparar la los diferentes solutos.
 Concentración molar del analito en la fase Estacionaria.
 Concentración molar del Analito en la fase móvil.
 factor que se puede experimentalmente y velocidad de migración de

α Factor de selectividad: relaciona los tiempos de retención de dos solutos y por lo tanto me permite saber la eficacia de la columna para separarlos.

$$\alpha = \frac{(T_{rb}) - T_m}{(T_{ra}) - T_m} = \text{Valor siempre } > 1$$

Este factor no toma en cuenta el ancho del pico

N Plato teórico: Altura de la fase estacionaria

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

A_s Asimetría: $\frac{b}{a}$ Ideal = 1 Aceptable = 0

R resolución: 8 a 1.3

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{W'_B + W'_A} =$$

IP Índice de polaridad: Magnitud que permite cuantificar la polaridad relativa de una mezcla de solventes que componen la fase móvil.

$$IP_{AB} = (\text{vol. relativo de A} \times IP \text{ de A}) + (\text{vol. relativo de B} \times IP \text{ de B})$$



El valor de **IP** de cada solvente lo obtengo de tabla; es conveniente trabajar, como mínimo, con dos solventes de polaridad diferente y es un parámetro a considerar cuando necesito aumentar la resolución, por ejemplo, en una cromatografía de adsorción.

8.2.4.1 Factores que afectan la eficiencia de la Cromatografía

- ✓ Difusión longitudinal
- ✓ Efectos de trayectorias múltiples

8.2.4.1. a Difusión:

- ✓ Tamaño de partícula de la fase estacionaria
- ✓ Sobrecarga del sistema
- ✓ Uniformidad del sistema

8.2.4. b Técnicas de Optimización:

- ✓ Reducir la altura de plato
- ✓ Modificar la fase móvil
- ✓ Aumentar la velocidad de flujo
- ✓ Aumentar el diámetro de la columna.

9. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o CLAR (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).⁽¹¹⁾

Es el método más moderno para realización de cromatografías.

Para pesos moleculares mayores a 10000 se utilizan cromatografías de permeación por geles y cromatografía de fase reversa.

Para pesos moleculares menores a 10000 y especies iónicas se utiliza Cromatografía por Intercambio Iónico.

Para especies no iónicas, polares y pequeñas se utiliza la cromatografía por partición o reparto.

Para especies no polares e isómeros estructurales, hidrocarburos alifáticos y alcoholes alifáticos se utiliza la cromatografía por adsorción o líquido sólido.

El HPLC es un método caro para el análisis de muestras, pero por otra parte es sumamente efectivo; Optimiza cientos de veces la velocidad de la cromatografía en columna y es altamente reproducible (siempre que utilicen las mismas condiciones de corrida se obtendrán los mismos resultados). Excelente para la cuantificación debido a los detectores on-line que utiliza.



Tiene una alta sensibilidad: en la cromatografía en columna de vidrio se utilizaban grandes cantidades de solvente, lo que diluía la muestra, disminuyendo la sensibilidad del método.

9.1. Fase Móvil

El tipo y la composición de la fase móvil (eluyente) son variables que influyen en la separación.

Las propiedades comunes a los diversos disolventes que se emplean son:

- ✓ Alta pureza (del orden de 99,999%).
- ✓ Compatibilidad con el detector.
- ✓ Solubilidad de la muestra.
- ✓ Baja viscosidad.
- ✓ Inercia química.
- ✓ Precio razonable

9.2 Instrumentos:

Son 8 componentes básicos:

- ✓ Reservorios de la fase móvil.
- ✓ Sistema de suministro de solvente.
- ✓ Elemento para introducir la muestra.
- ✓ Columna.
- ✓ Detector.
- ✓ Reservorio de residuos.
- ✓ Tuberías de conexión.
- ✓ Integrador o computadora

En la cromatografía se pueden usar eluciones con un solo solvente (elución ISOCRÁTICA) o con diferentes solventes que varían sus concentraciones con el tiempo (elución en **gradiente**).

Esta segunda forma de suministrar solvente suele generar mejores separaciones. Para poder realizar una elución en gradiente es necesario contar con una computadora para programar la variación de solventes en función del tiempo de corrida.

Las propiedades de los eluyentes que se pueden variar para producir elución en gradiente son:

- ✓ Fuerza iónica.
- ✓ pH.
- ✓ Constante dieléctrica

9.2.1 Bombas.

Son un sistema de suministro de disolvente, deben asegurar un suministro de caudal libre de pulsos, constante, reproducible y preciso; si se provocan pulsos en los flujos estos son



indeseables ya que causan problemas a la hora de la detección e impiden un buen análisis cuantitativo y conducen a una temprana falla de la columna

Existen actualmente 3 tipos de bombas para los equipos de HPLC:

- ✓ Recíprocantes o a pistón.
- ✓ Tipo jeringa o de desplazamiento.
- ✓ Neumática o de presión constante

9.2.1. a Bombas de pistón

Se usan en el 90 % de los equipos y consisten generalmente en una cámara pequeña (35 μ L a 400 μ L), en la que el disolvente se bombea hacia delante y hacia atrás mediante un pistón movido por un motor. Dos válvulas que se abren y cierran alternadamente, controlan el flujo del disolvente hacia adentro y fuera de un cilindro. En el movimiento hacia atrás, el pistón aspira el eluyente desde el reservorio y debido a las válvulas de chequeo se cierra la salida a la cámara de separación. Durante el avance, el eluyente es empujado dentro de la columna y la entrada del reservorio se cierra, el movimiento de bombeo del pistón produce un flujo de pulsos que requiere atenuación.

Estas bombas generan una alta presión de salida con caudales constantes y la posibilidad de usar la elución por gradiente.

9.2.2 Muestras:

Antes de inyectar la muestra en el equipo, hay que tenerla en estado líquido o en solución, y tener en claro que sea compatible tanto con la fase móvil como con la fase estacionaria. Se pueden inyectar cantidades que varían entre 1 μ l a 100 μ l; generalmente se inyectan entre 5 μ l y 10 μ l. Las cantidades inyectadas varían dependiendo de la sensibilidad y el rango dinámico del detector.

El tiempo de análisis puede variar entre 5 min y 2 h dependiendo del tiempo de preparación de la muestra, entre otras cosas.

La preparación de cada muestra es totalmente diferente, y puede consistir en una hiperfiltración, dilución, pre concentración, extracción, etc.

9.2.3 Pre columnas:

Se colocan antes de la columna analítica para incrementar su vida, eliminando el material particulado y los contaminantes del solvente.

Además, sirven para saturar la fase móvil con la fase estacionaria de manera de minimizar las pérdidas del solvente de la columna analítica.



La composición del relleno de la columna de guardia debe ser similar a la de la columna analítica, pero el tamaño de partículas es generalmente más grande. Cuando se contamina, se rellena nuevamente o se descarta y reemplaza por una nueva del mismo tipo.

9.2.4 Columnas:

Se construyen de acero inoxidable, plástico, aunque a veces hay de vidrio. En el caso de ser de vidrio (menos común), la presión máxima de trabajo es 600 psi.

- ✓ Columnas analíticas: La mayoría de las columnas tiene entre 10 cm y 30 cm. Normalmente son rectas y pueden tener largos adicionales como acoples de una o más columnas. Su diámetro interior está comprendido entre 4 mm y 10 mm y los tamaños de partícula del relleno más comunes son 3 μm , 5 μm ó 10 μm .

9.2.5 Detectores:

El rol más importante del detector de HPLC es monitorear los solutos a medida que eluyen. Genera una señal eléctrica, proporcional al nivel de alguna propiedad de la fase móvil o de solutos.

Las características necesarias de un buen detector de HPLC son:

- ✓ Sensibilidad.
- ✓ Linealidad.
- ✓ Confiabilidad.
- ✓ Fácil de usar.
- ✓ Bajo volumen muerto

Existen dos grandes grupos de detectores:

- ✓ De propiedades masivas, moduladas por la presencia de solutos, como por ejemplo, el índice de refracción o la densidad de la fase móvil.
- ✓ De propiedades del soluto, como por ejemplo absorbancia de radiación UV, fluorescencia o corriente de difusión. Estos son más sensibles que los primeros en el orden de 1000 veces o más.

9.2.6 Detectores de absorbancia al UV

- ✓ Es utilizado en más del 70 % de los equipos HPLC.
- ✓ La señal es proporcional a la concentración del soluto.
- ✓ Se detectan alquenos, compuestos aromáticos y aquéllos que tienen uniones múltiples C,O,N, y S.
- ✓ La fase móvil no debe interferir en la detección
- ✓ Otros detectores:



- ✓ De conductividad: es un detector universal de iones, pero no sirve para elución en gradiente.
- ✓ Electroquímicos: miden la corriente eléctrica asociada a la oxidación o reducción de los solutos a la salida de la columna, y son especialmente sensibles, pero no sirven para elución en gradiente.

9.2.7 Columnas más utilizadas en HPLC

- ✓ Cromatografía de reparto: es la más utilizada y se puede subdividir en líquido - líquido y de fase unida según como se une la fase estacionaria a las partículas de relleno.

En líquido – líquido, la fase estacionaria es mantenida sobre la superficie de las partículas del relleno por adsorción física. En la fase unida, se une químicamente a las partículas del soporte. La desventaja más importante de la líquido – líquido es la pérdida de fase estacionaria por disolución en la fase móvil, lo que requiere recubrimientos periódicos del soporte

9.3 Fase Normal y reversa

Dentro de este equilibrio se trabaja con dos tipos de fases estacionarias:

9.3.1 Fase Normal: el componente principal de la fase estacionaria es muy polar (ej. sílice) y la fase móvil es poco o medianamente polar.

Bajo estas condiciones los compuestos poco polares eluyen primero, no obstante pueden cambiarse las condiciones variando el IP del solvente. Actualmente en desuso ya que ciertos solventes modifican de a poco la fase estacionaria, perdiendo reproducibilidad.

9.3.2 Fase Reversa:

La fase estacionaria es poco polar, normalmente sílica tratada (siloxano) con cadena carbonada de C₈H₁₇.

La fase móvil es polar. En estas condiciones los compuestos menos polares son más retenidos eluyendo primero los más polares junto con la fase móvil son actualmente las más utilizadas y su vida media es mayor a las de fase normal.



10. Información De La Especie De Estudio ⁽¹²⁾

10.1. *Zingiber officinale* roscoe (Zingiberaceas). Partes de la planta de uso médico: la raíz (el rizoma), pelada y sin corcho. Denominación farmacológica: Raíz de jengibre *Rhizoma Zingiberis* (también *Radix zingiberis*).

10.2. Botánica y obtención

10.2.a. Presencia y descripción de la planta:

Originaria, probablemente, del archipiélago de las Bismarck, aunque no se está seguro sobre este punto. Se cultiva desde la India hasta Malasia, en China y en otras regiones de los trópicos, siendo utilizada principalmente como especia. El rizoma crece horizontal en el suelo y se ramifica en un solo plano. Los elementos cortos se comprimen a veces lateralmente. El tallo llega a medir más de 1 m. Las espigas florales en posición terminal son coniformes y van provistas de grandes brácteas verdes. Sobre un cáliz en forma de embudo aparece una corola tubuliforme con 3 puntas lanceoladas, muy similares. En la flor destaca un labelo trilobulado y con manchas de color amarillo-violeta-pardo

10.1.b. Recolección y preparación:

El jengibre de uso medicinal y culinario procede exclusivamente de cultivos. En primavera se entierran en un terreno bien abonado trozos de rizoma y al cabo de unos 10 meses se hace la recolección. Tras un cuidadoso lavado y pelado se dejan en reposo las raíces por espacio de unas 24 horas y se las deseca al sol.

10.1.c. Sustancias activas: Aceite esencial (al menos un 1.5%) con zingibereno, el gingerol de sabor picante y shogaol.

10.1. d. Acción curativa y uso: El jengibre es un medio excelente para estimular el apetito y activar los procesos digestivos. Contra los dolores de estómago e incluso para las úlceras gástricas un tratamiento con esta planta puede tener éxito. Suele prescribirse casi siempre la tintura, de la que se administran 20 gotas 3 veces al día; el uso del té es mucho menos frecuente.

10.1. e Empleo como condimento: El jengibre no solamente es muy apreciado en China y en la India, sino que se utiliza asimismo para preparar frutas escarchadas, principalmente calabaza y pepino. También en las sopas, salsas, platos de volatería, caza y arroz de diversos tipos esta especie aromática y de sabor intenso y refrescante enriquece los alimentos. Pero muestra asimismo ventajas para la salud: es beneficioso para las personas que padecen de un estómago nervioso, meteorismo y nada les gusta. El jengibre está también permitido en las úlceras de estómago.



10.1. f. Utilización en homeopatía: El homeopático **Jengibre** se utiliza en las potencias una a seis (D₁ a D₆) para la atonía gástrica, los trastornos digestivos y el asma bronquial. Se le administra también contra la flatulencia que se presenta al comer pan, así como contra la retención de la orina. La dosis adecuada son de 5 a 15 gotas entre 2 y 3 veces al día.

10.1. g. Efectos secundarios: No se conocen.

10.2. Identificación química ⁽¹³⁾

Para la identificación química de artículos botánicos se preparan extractos, los cuales son mezclas complejas de varios constituyentes químicos. Para la gran mayoría de extractos botánicos, se puede decir que no se conoce certeza cuál de los componentes es el responsable del efecto farmacológico reportado. Generalmente se cree que varios constituyentes actúan sinérgicamente para proveer el efecto reportado. Para el material vegetal que posee una monografía, ciertos constituyentes químicos son elegidos y se describen ensayos cuantitativos para evaluar su contenido. La elección de tales componentes, generalmente conocidos como marcadores, está basada en ciertas consideraciones. Actualmente, los siguientes tipos de marcadores son especificados en las monografías y pueden ser identificados en la materia prima.

10.2. a Principios activos: Son constituyentes que tiene actividad clínica probada. El contenido mínimo o rango para los principios activos es especificado usualmente en la monografía individual. Una determinación cuantitativa de los principios activos durante los estudios de estabilidad de las formas de dosificación botánicas proporciona la información necesaria para llegar a la fecha de vencimiento conveniente.

10.2. b. Macerados activos: son compuestos que tienen actividad farmacológica conocida y contribuyen en cierto grado a la eficacia. Sin embargo, la eficacia clínica para estos constituyentes puede no estar demostrada. Un contenido mínimo o rango de marcadores activos es especificado usualmente en la monografía individual. Una determinación cuantitativa de los marcadores activos durante los estudios de estabilidad de las formas de dosificación botánicas, proporciona la información necesaria para llegar a la fecha de vencimiento conveniente.

10.2.c. Marcadores analíticos: Cuando los principios activos ni los marcadores activos son definidos, otros constituyentes son utilizados para la determinación cuantitativa. Estos marcadores ayudan en la identificación del material. Manteniendo un contenido mínimo o rango específico de los marcadores analíticos podemos llevar a cabo la estandarización del extracto vegetal y obtener la fecha de vencimiento conveniente durante los estudios de estabilidad.



10.2.d. Marcadores negativos: son constituyentes que pueden tener propiedades tóxicas o alérgicas, siendo indeseable su presencia en el extracto botánico. Ejemplo de estos son los ácidos ginkgolicos del ginkgo. Un límite riguroso de estos marcadores puede ser especificado en la monografía individual.

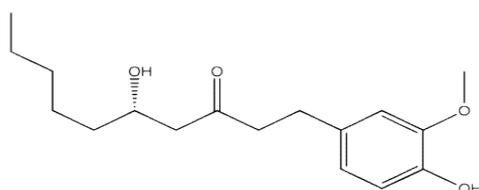
10.2. e. Determinación cualitativa de metabolitos secundario: El cribado fitoquímico tiene como objetivo general la determinación cualitativa de los principales grupos químicos presentes en el material vegetal y que por lo general son los grupos responsables de la actividad farmacológica. Estos ensayos son simples y pueden utilizarse de forma general para la caracterización de extractos obtenidos de material vegetal pero no son ensayos cuantitativos, por lo tanto, no indican por si solos la calidad de material vegetal.

11. 10-Gingiol

Formula

$C_{17}H_{26}O_4$

Estructura



Formula

$C_{17}H_{26}O_4$

Masa

294.39

Punto de fusion , °C

30 - 32

Punt de ebullicon, °C

453

Vapor pressure, mmHg

$5.4E-9$ (25 C)

Densidad

1.083 g/cm³ (20 C)

Solubilidad en agua

Insoluble

Índice de refracción

1.5224

PKa / PKb

10.02 (pKa)

Coefficiente de partición, pK_{ow}

2.49

Temperature de vaporizacion

75.1 kJ/mol



MATERIAL Y METODO



MATERIAL Y METODO

Tipo de estudio: Experimental

Universo: 7 productos fitomedicinales conteniendo extracto de jengibre, Alcachofa-Jengibre extracto, ginger root, glucosamina completa, ginger, jengibre formula forte, vein-tain, gastritix , jengibrol niños , jengibrol adulto.

Muestra: Jarabe Fitomedicinal conteniendo extracto de jengibre para niño y forte para adultos

Criterios de exclusión: Productos fitomedicinales conteniendo extracto de jengibre que procedan de un fabricante que no contengan licencia sanitaria

Criterios de inclusión: Productos fitomedicinales conteniendo extracto de jengibre que procedan de un fabricante que contengan licencia sanitaria.

Criterios de Selección: Producto Fitomedicinal conteniendo extracto de jengibre más comercializado de acuerdo a consulta en establecimientos de comercialización

Variables de estudio:

- ✓ 10-gingirol
- ✓ Tiempo de retención de Picos cromatograficos
- ✓ Área de Pico Cromatografico

Tabla No.1 Operacionalización de las variables

Variable	Definición	Unidad de medición
10-gingirol	Es el componente activo de la fresca del jengibre. ⁽¹⁴⁾	Ucg /ml
Tiempo de retención de picos cromatograficos	Es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector. ⁽⁴⁾	minutos
Área de pico cromatografico	Es la comprendida entre el pico y la prolongación de la línea de base ⁽¹⁵⁾	Milímetros



PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.1 Extracción de principios activos por reflujo de la materia prima (referencia)

- ✓ Se pesó 10 g de materia prima de jengibre en un balón fondo redondo 250 mL
- ✓ Se adiciono 100 mL de Tolueno y se realizó la extracción por reflujo durante una hora.
- ✓ Se filtró y evaporo hasta aproximadamente 20 mL a temperatura baja (50°C)
- ✓ Se enfrió a temperatura ambiente para hacer la siembra en CCF.

1.2 Extracción de principios activos de muestra de ensayo (Separación liquido-liquido)

- ✓ Se colocó 240 mL (2 jarabes) en un embudo separador de 500mL
- ✓ Se adiciono 40 mL de metanol .
- ✓ Se extrajo por inversión o agitación durante 5 min.
- ✓ Se dejó reposar para que se dé la separación de capas
- ✓ Se decantó la fase orgánica en un Beaker se 250 mL
- ✓ Se realizó la extracción por triplicado
- ✓ Evaporar todo el extracto recogido a temperatura baja (50°C) hasta aproximadamente 20 mL
- ✓ Enfriar a temperatura ambiente para hacer la siembra en CCF e inyección en HPLC

1.3 Identificación. TLC

Preparación de la fase móvil

Se realiza la preparación de la fase móvil utilizando una mezcla de Tolueno: Acetato de etilo 70:30.

- ✓ Se procedió a la saturación de la cámara una vez incorporada la fase móvil en la cámara cromatografía, por un tiempo no menor a 1 hora
- ✓ Se procedió a calentar la placa a 100 °C por espacio de 15 minutos para su activación previo a utilización ,y se realizó la siembra
- ✓ Se procedió a disolver 5 mg de gingirol en 5 ml de fase móvil para una concentración de 1000 µg/ml
- ✓ Se procedió a la siembra, con ayuda de un capilar sobre la superficie de la placa cromatografica, se secó con una pistola de aire , y se aplicó un segundo capilar de 100 µl de muestra (se realizó la siembra por triplicado , secando con aire seco).
- ✓ Se Introdujo en la cámara cromatográfica por espacio de 45 min y se efectuó la corrida cromatografica.
- ✓ Se realizó la identificación de la muestra vs estándar Rf aproximadamente: 0.6 ± 0.03 cm.



1.4 Ensayo de HPLC ,Condiciones de Ensayo

- ✓ Columna Fase reversa BIO-SIL-10 C₁₈, 10µm 250x4 mm
- ✓ Fase móvil Agua : Acetonitrilo (150:100)
- ✓ Flujo 1ml/min
- ✓ Longitud de onda 282-nm
- ✓ Detector : UV/Vis
- ✓ Volumen de inyección 20 µL
- ✓ Tiempo de retención aproximadamente 6.5 min



RESULTADOS

Y

ANÁLISIS DE

RESULTADOS



Extracción de principios activos por reflujo de la materia prima (referencia B)

En la extracción del principio activo por reflujo de la materia prima (referencia) en metanol y tolueno, se obtuvo individualmente, un volumen final de 100 ml de ambas extracciones, las cuales posteriormente fueron filtradas para inyección en HPLC y corrida en TLC, para lo cual la extracción con metanol evidencio mejor capacidad de extracción en función de la constante dieléctrica del solvente (33.6), para el caso de tolueno (2.38), Metanol, esto en base a que el gingirol es un terpeno (monoterpeno) cilicio, aromático de PKa 10.02 lo cual justifica su solubilidad en la extracción con alcohol absoluto .



Extracción de principios activos de muestra de ensayo (Separación liquido-liquido) y Evaporación inclusive

Para la extracción liquido-liquido del principio activo gingirol a partir de la matriz del jarabe, se realizó la extracción con tolueno (Constante dieléctrica 2.38), teniendo como base que el compuesto en estudio posee coeficiente de partición de 2.49. Lo que justifica la solubilidad relativa en el solvente seleccionado, en base al principio de solubilidad de igual disuelve igual. Posterior a la extracción liquido-liquido se procedió a evaporar el tolueno a temperatura de 60 °C considerando su temperatura de inflamación de 159 °C, para redissolver posteriormente en metanol (Constante dieléctrica 33.6). Para ser utilizado posteriormente, en la inyección en HPLC y corrida en TLC.





Identificación T.L.C

La identificación cualitativa en cromatografía en capa fina evidencio que la fase móvil 70:30 (constante dieléctrica de 3.472) compuesta por Tolueno (Constante dieléctrica 2.38): Acetato de etilo (Constante dieléctrica 6.02), utilizada , muestra capacidad de separación del analito de interés para su identificación cualitativa , siendo que la referencia A 10-gingirol presenta un Rf de 0.71 mm , referencia B en tolueno Rf de 0.70 mm , muestra de jarabe de jengibre para niño 0.70 mm, muestra de jarabe de jengibre para adulto 0.72 mm , estándar de referencia A 10-gingirol en metanol Rf de 0.51 mm, siendo que la constante dieléctrica de la mezcla de fase móvil es de 3.472 y el valor de la constante dieléctrica del metanol es de 33.6 se muestra el menor valor de Rf a fin a la fase estacionaria por las características del disolvente metanol en el cual se encuentra el analito , y siendo que el coeficiente de reparto del analito es de 2.49 , justifica la solubilidad relativa en la mezcla de solventes seleccionados para el ensayo y afinidad a la fase móvil ensayada

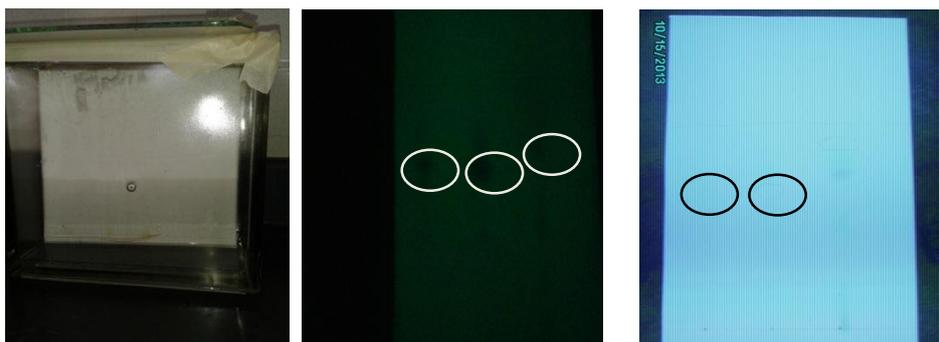




Tabla N° 2. Resultados de Tiempos de retención, área, altura, ancho, simetría y concentración de perfiles cromatograficos

Compuesto	Tiempo de Retención	Área del pico	Altura del pico	Ancho del pico	Simetría del pico (simetría <1)	Numero de platos teóricos N	Factor de capacidad K 1-20	Concentración ucg/ml
Estándar de Referencia-A 10-Gingirol (en <i>metanol</i>)	6.29	26469.2	982.8	0.4089	0.851	3786.05	2.75	1666.6
Estándar de Referencia-A 10-Gingirol (en <i>metanol</i> / estabilidad del estándar)	6.521	28871	1061.1	0.4135	0.874	3979.2	2.95	1817
Estándar de Referencia-A 10-Gingirol(límite de detección/ <i>metanol</i>) *	6.467	2850	80.8	0.5223	1.169	2452.9	2.84	48.54
Estándar de Referencia-B (en <i>tolueno</i>) *	6.351	2037.2	73.4	0.4097	0.907	3844.7	4.11	128.26
Estándar de Referencia-B (en <i>metanol</i>) *	6.521	1767.4	60	0.431	0.842	3662.6	3.26	1112.82
Muestra A Jarabe de Jengibre para adultos(<i>Eter</i>) *	5.83	15946.5	508.2	0.4578	0.833	2594.8	3.7	1003.68
Muestra A Jarabe de Jengibre para adultos (re disuelto <i>metanol</i>) *	6.545	7567	242.6	0.4557	0.943	3300.5	2.7	476.4
Muestra B Jarabe de Jengibre para niños (<i>Eter</i>)	5.833	4909	153.5	0.4677	0.789	2488.6	3.7	309.08
Muestra B Jarabe de Jengibre para niños (re disuelto <i>metanol</i>)	6.584	3166.7	112.5	0.4201	0.955	3930.0	2.5	199.38

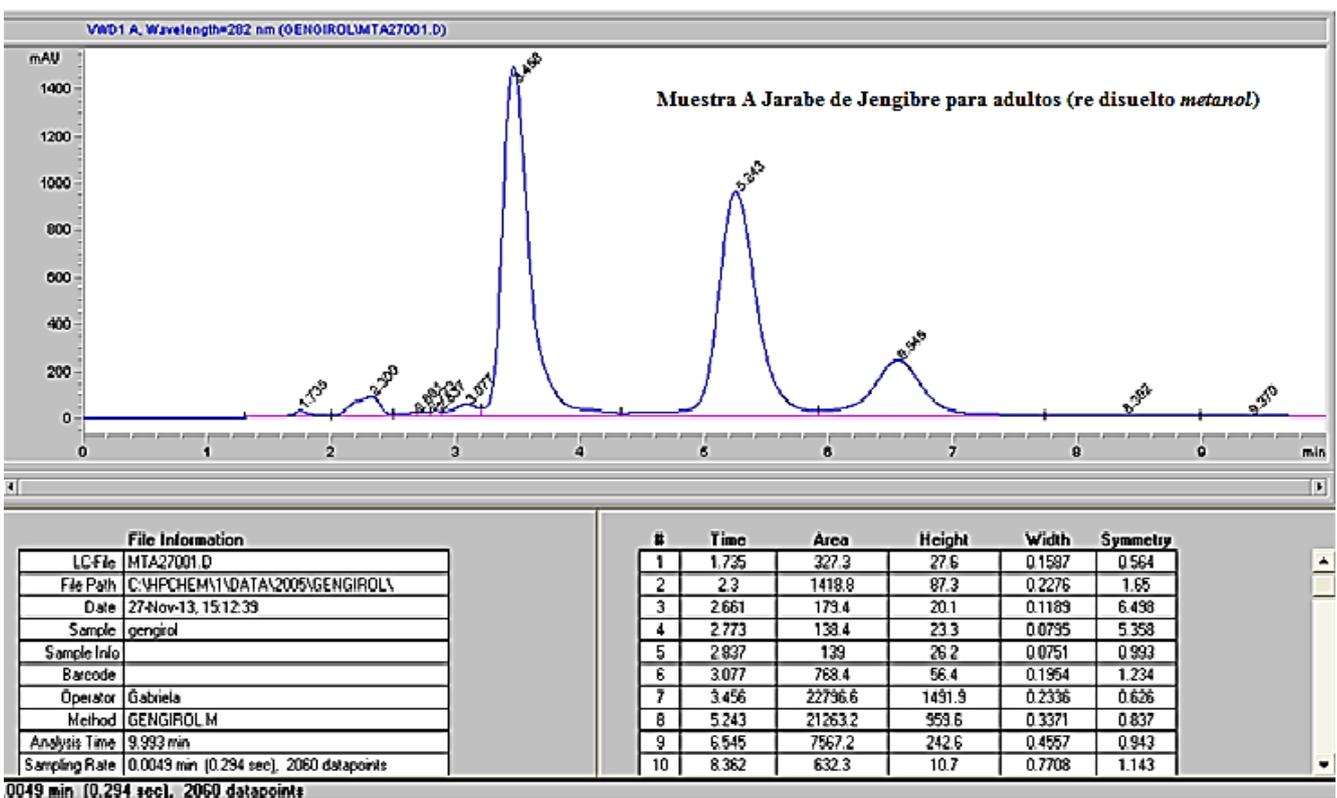
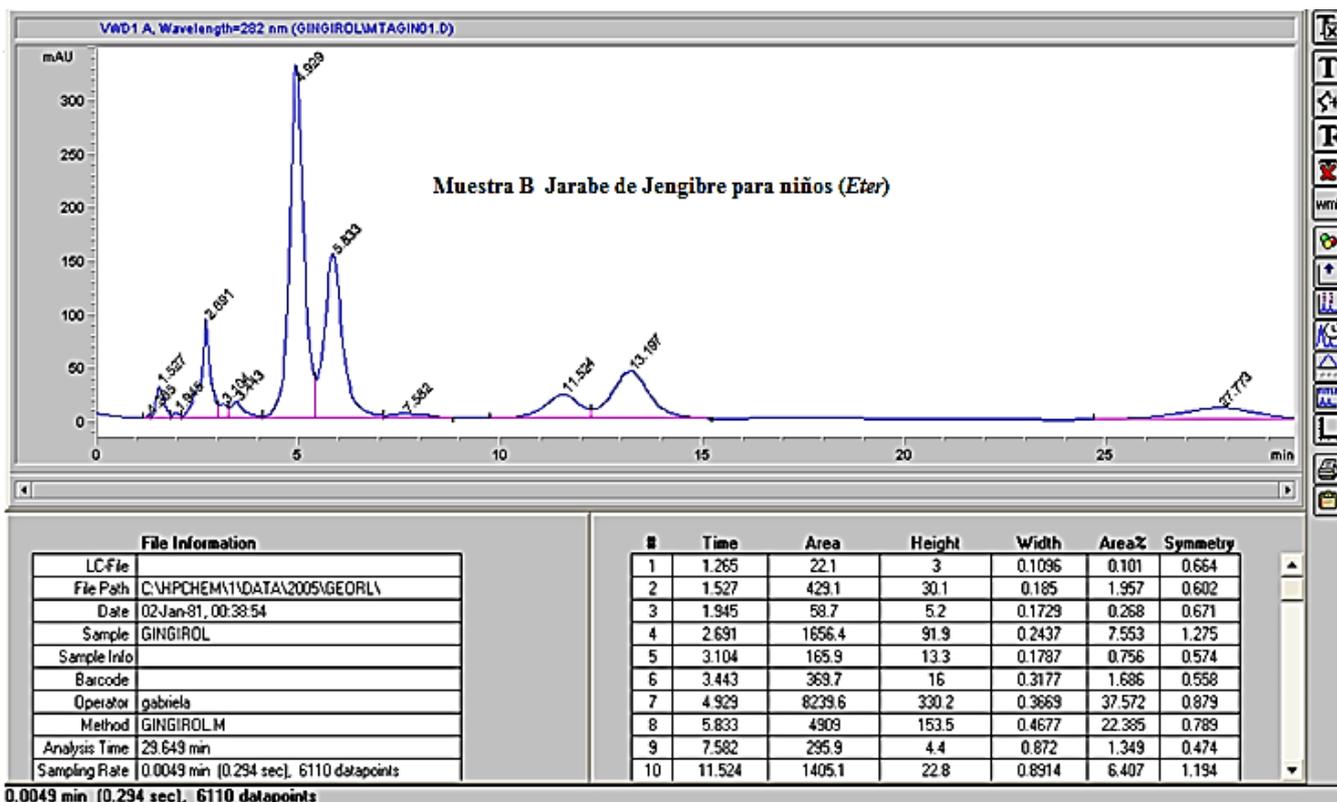
Para el caso de los tiempos de retención de la referencia B extraída en metanol (6.521 min) y extraída tolueno (6.351 min) , estos muestran ser próximos entre sí , afirmando la huella del analito contenida en la matriz de ensayo ,en comparación con el tiempo de retención estándar de referencia A (6.29 min) disuelto únicamente en metanol ; lo anterior en vista que las condiciones de fase móvil (polar constante dielectrica de 48.5) y columna (empaque no polar) sitúan la elución de los compuestos más polares en primer orden; para el caso de las muestras de jarabes de jengibre extraídos con tolueno redisolventes en metanol evidencian mantener la huella de los tiempos en comparación con el estándar de referencia A y la referencia B obtenidas en matriz de metanol y tolueno , no obstante las muestras de jarabes de jengibre extraídos únicamente con éter sin redisolventes en metanol manifiestan tiempos de elución menor en relación a la huella del tiempo de retención estándar de referencia A (6.29 min) y referencia B en tolueno y metanol, lo anterior en base que el éter posee una constante dieléctrica de 4.34 , difiriendo las condiciones de fase móvil (polar constante dielectrica de 48.5) y columna (empaque no polar) .

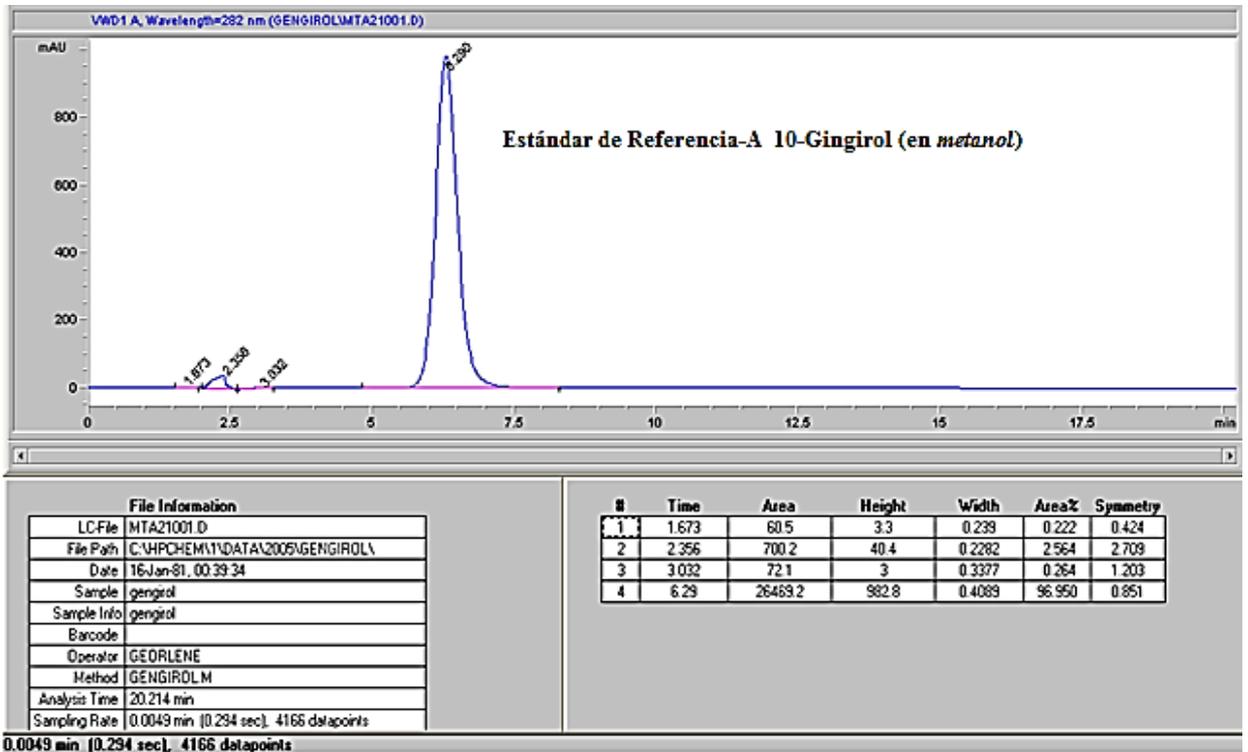
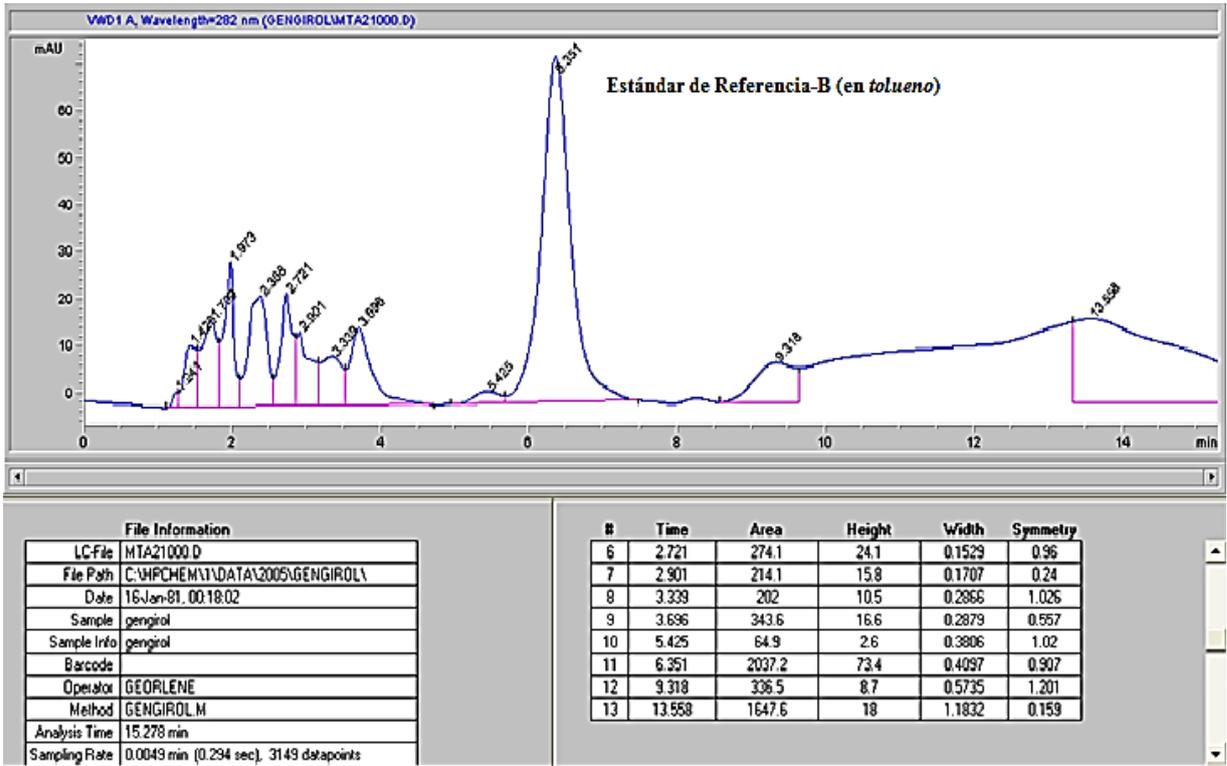


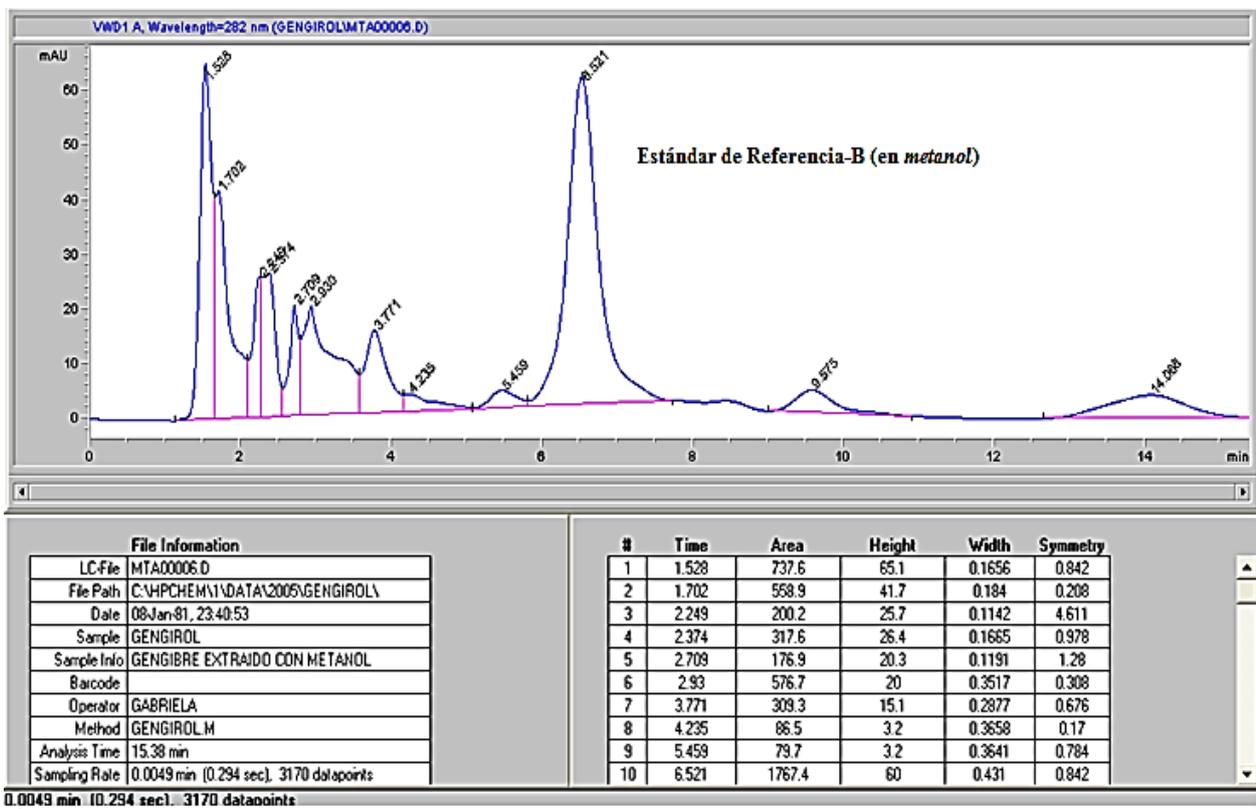
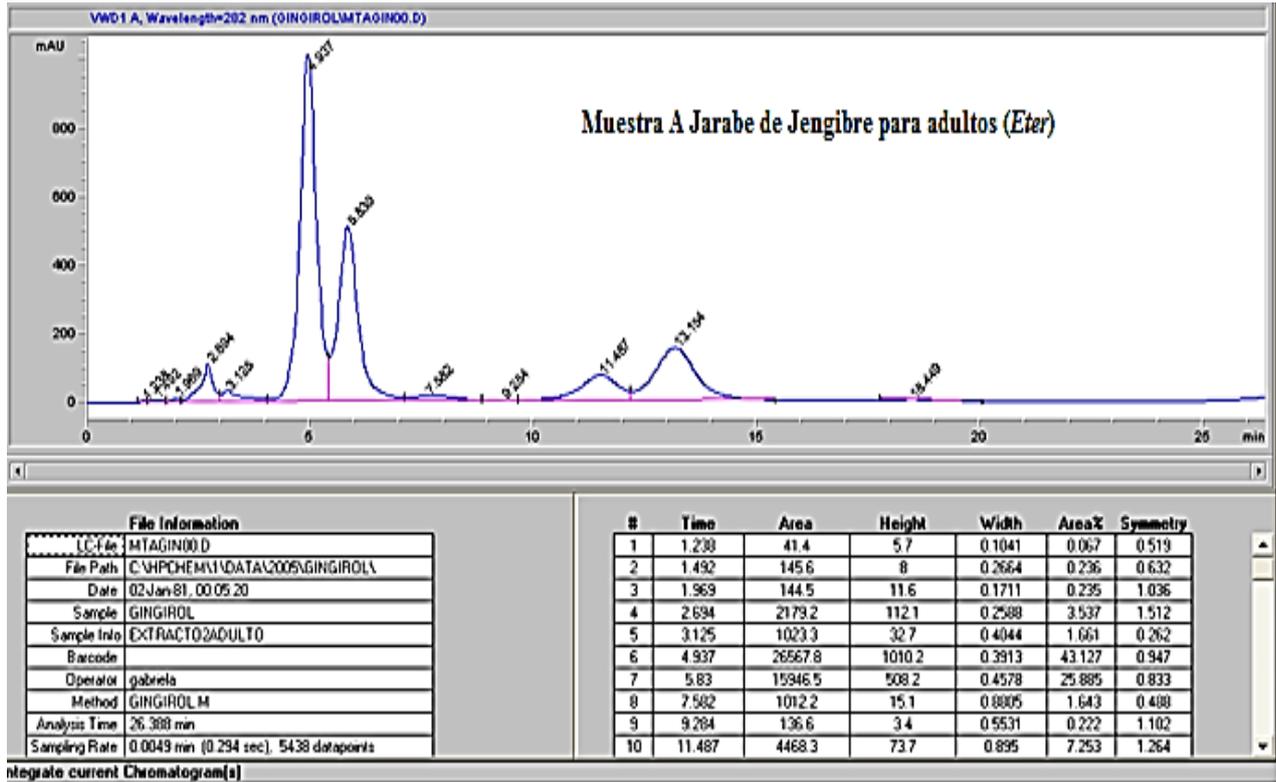
Para la simetría se observa que exceptuando la muestra de Referencia-A 10-Gingirol (límite de detección/*metanol*) que presenta una simetría de 1.169 rango de simetría < 1 los restantes cromatogramas se exciben dentro de dicho rango de simetría < 1 , No obstante únicamente el cromatograma del Estándar de Referencia-A 10-Gingirol (en *metanol*) evidencia un pico simétrico (picos gaussiano), los restantes muestran característica de cola (asimetría positiva) y distorsión frontal (asimetría negativa), excluyendo la Muestra B Jarabe de Jengibre para niños (*Éter*) , que mostro la menor simetría y exhibió picos no resueltos , lo que refuerza lo enunciado en el párrafo anterior en cuanto a la elución de compuestos dándose una saturación de columna.

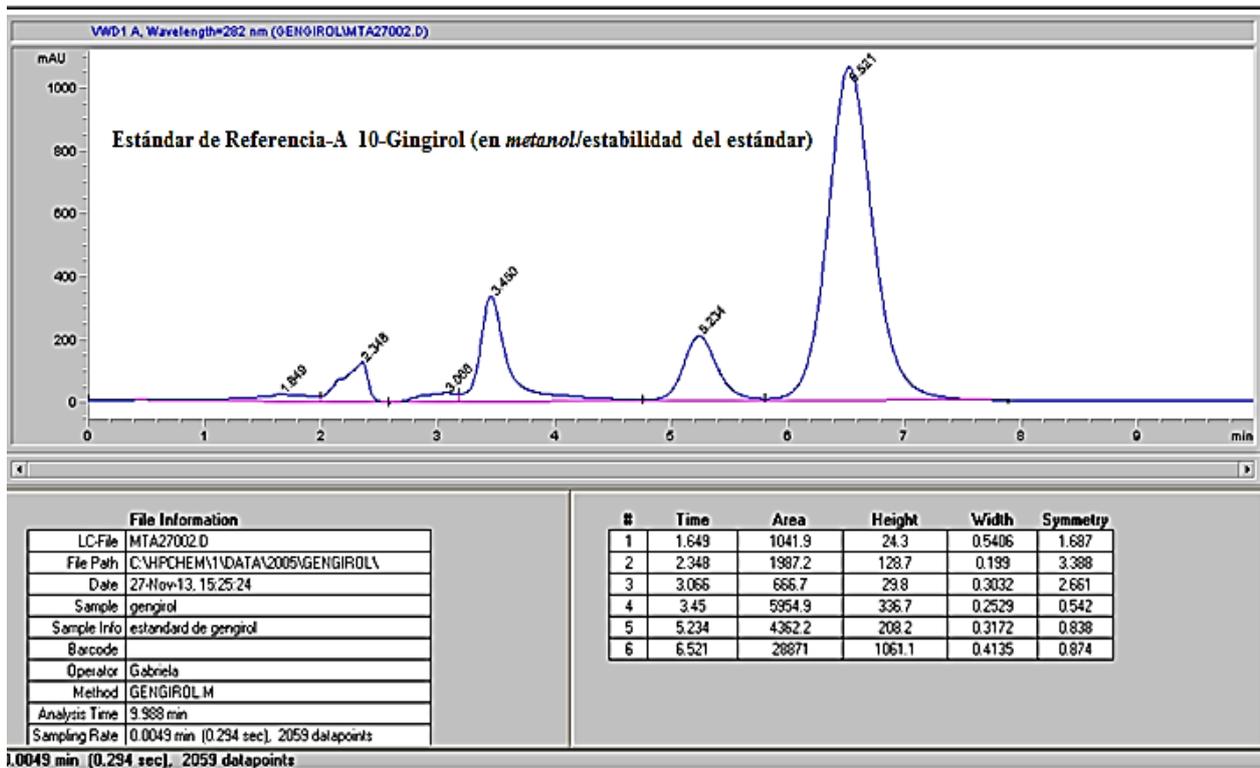
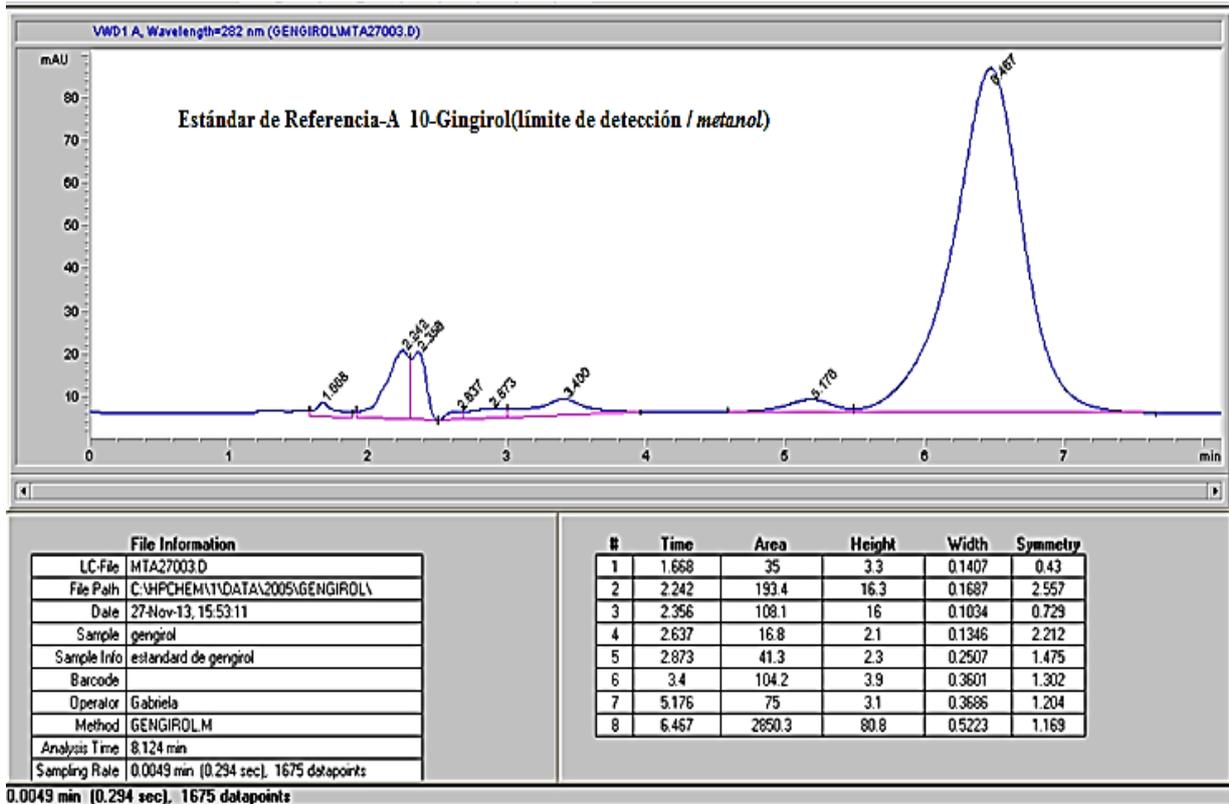
Para el caso del cálculo del número de platos teóricos y su efecto sobre la simetría y tiempos de retención de los cromatogramas, la tabla evidencia que el menor número de platos teóricos (menor de 3000) corresponde al Estándar de Referencia-A 10-Gingirol (límite de detección/*metanol*), que presento simetría >1 , manteniendo su tiempo de retención huella ; la Muestra A Jarabe de Jengibre para adultos(*Éter*) y Muestra B Jarabe de Jengibre para niños (*Éter*) si bien presentaron simetría < 1 , no mantuvieron su huella de retención siendo el valor de $N = 2594.8$, para la Muestra A Jarabe de Jengibre para adultos(*Eter*) y $N = 2488.6$, Muestra B Jarabe de Jengibre para niños (*Éter*) mostrando que el disolvente en el cual se encontraba el analito (éter constante dielectrica de 4.34) influye sobre las condiciones de fase móvil (polar constante dielectrica de 48.5) y columna (empaque no polar) .

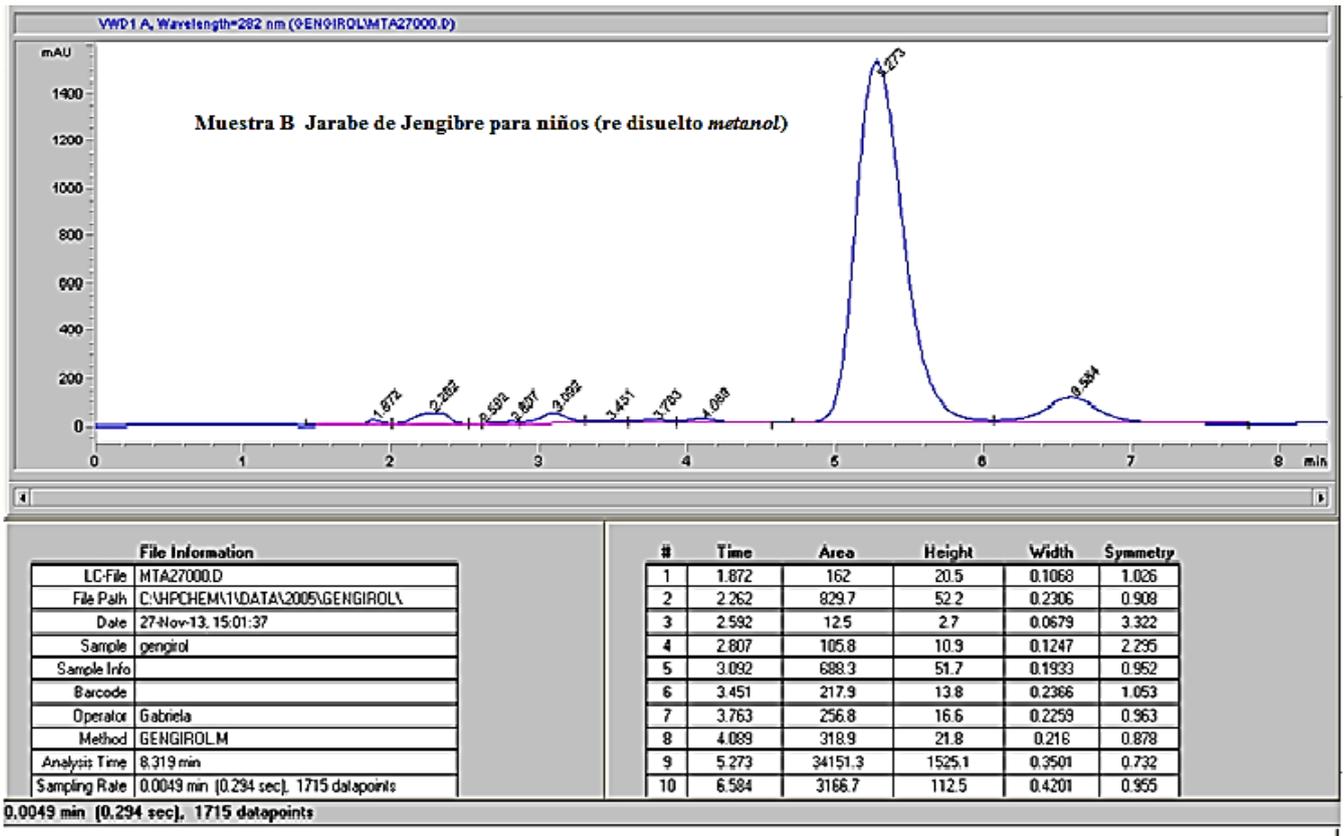
El factor de capacidad K de los cromatogramas de las muestras de Estándar de Referencia-A 10-Gingirol referencia B extraída en *metanol* y *tolueno* , así como muestras problemas jarabes de jengibre muestran rangos de 2.5-4.11 , lo cual indica que la velocidad de migración de los solutos (analitos) en la columna utilizada BIO-SIL ODS 10 micrómetro de fase reversa 250 mm x 4 mm es aceptable en base a qué valores menores de la unidad eluyen con demasiado rapidez y no evidencian buena resolución y mayores de 20 los tiempos de retención son excesivamente prolongados favoreciendo al apareamiento de distorsión frontal o cola en los picos de los cromatogramas obtenidos .













CONCLUSIONES



El presente análisis de resultado expone la característica de la muestra, empaque de la fase estacionaria y solvente (fase móvil) utilizados.

Para lo cual se puede evidenciar en los cromatogramas que el analito (10-gingerol/ sesquiterpeno) bien puede ser extraído con tolueno o metanol para matrices de referencia de jengibre (*Zingiber officinalis*), así como estándar puros de calidad conocida, esto en base a que, el compuesto de interés, posee un PK_a 10.02, soluble tanto en alcohol absoluto como solventes orgánicos de polaridad baja.

En el presente estudios no pudieron ser determinadas como es debido todas las variables de un método analítico cromatográfico, considerando las limitantes de poca cantidad de ensayo de referencia que se disponía (estándar de referencia A 10-gingirol), columna envejecida, falta de cualificación de equipo, falta de cálculo de incertidumbre de cristalería, balanza y otros instrumentos utilizados, si bien la limitación mencionada, ya se ha descrito en otros trabajos publicados sobre técnicas cromatográficas instrumentales en el análisis de productos naturales, igualmente es conocido que los parámetros de retención (tiempo o volumen) de un compuesto, constantes para un sistema cromatográfico dado, pueden ser utilizados de forma cualitativa para identificar compuestos.

Una última consideración sobre la utilización de las técnicas cromatografías para el análisis cualitativo, es que estas técnicas permiten realizar una identificación negativa, es decir, permiten asegurar con absoluta certeza que un compuesto determinado no se encuentra presente en una mezcla, pero, por el contrario, no permiten nunca asegurar la presencia de un compuesto, ya que no se puede excluir la posibilidad de que dos compuestos diferentes presenten los mismos parámetros de retención sobre un sistema dado. Este problema puede soslayarse en parte realizando la identificación sobre diversas columnas, con diferentes fases estacionarias. Por supuesto, es obvio que los resultados cualitativos son más fiables cuanto mayor número de columnas se utilicen, pero el método es largo y tedioso; como norma general se puede decir que la identificación de un compuesto sobre tres columnas, aunque no proporciona una certeza absoluta, ofrece una fiabilidad suficiente a todos los efectos.



El presente estudio evidencia que la extracción bien sea en metanol o tolueno para la matriz de ensayo (rizoma de *Zingiber officinalis*) muestran ser eficientes para su valoración bien sea el caso por TLC en base los valores de Rf anteriormente expuestos en los resultados en las condiciones de ensayo, o por cromatografía líquida de alta resolución HPLC tanto matriz vegetal (rizoma de *Zingiber officinalis*) y producto terminado (Jarabe de jengibre).



RECOMENDACIONES



1. Retomar el estudio para su validación, con la medición de parámetros algunos para tal efecto como cualificación de equipo e incertidumbre.
2. A la hora de realizar las comparaciones, utilizar determinados parámetros, que si bien no eliminen todas las posibilidades de variabilidad de los resultados, permiten al menos corregir la variabilidad inducida por determinadas condiciones ; como parámetros de retención utilizados frecuentemente para análisis cualitativo, Tiempos o volúmenes de retención corregidos, Factores de capacidad. Tiempos de retención relativos.
3. Valorar en el análisis de productos Fitomedicinales como mínimo las recomendaciones emitidas por el RTCA 11.03.56.09 (Reglamento Técnico centro americano de verificación de la calidad de productos naturales) **Anexo 2. Tabla N4**
4. Garantizar al menos un estándar de referencia de pureza conocida al trabajar en la verificación de la calidad de productos de origen natural, que soporten la validez de la identificación cualitativa del analito de interés.
5. Incentivar la investigación cualicuantitativa en las empresas que elaboraran productos Fitomedicinales con la finalidad de contribuir a garantizar la calidad y eficacia de los productos elaborados, consumidos por la población Nicaragüense.



BIBLIOGRAFIA



1. Riaño C. N. (2007). Fundamentos de química analítica básica. [En línea]. Recuperado el 07 de octubre del 2013 de http://books.google.com.ni/books?id=CfxqMXYfu7wC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
2. AEFI. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona.[Libro]. (pág. 126-130).
3. Tesis Doctoral. Lucio G. J. (2012). Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales.[En línea]. Recuperado el 29 de noviembre del 2013 de: <http://grupsderecerca.uab.cat/chemometrics/sites/grupsderecerca.uab.cat.chemometrics/files/Tesis%20JRLG.pdf>
4. Escuela de química. (2008). Instrumento Analítico. Guía de Cromatografía. [En línea].Caracas. Recuperado el 14 de octubre del 2013 de <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>
5. Machado R. L.. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapeuticos. [Libro].Colombia. (pág. 161-165).
6. Textos científicos. (2007).Cromatografía en capa fina .[En línea].Recuperado el 10 de octubre del 2013 de <http://www.textoscientificos.com/química/cromatografia/capa-fina>
7. Estructura química del almidón.[En línea].Recuperado el 29 de noviembre del 2013 de <https://www.google.com.ni/search?q=estructura+quimica+del+almidon&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=1hidUu21Mc7lsAS7kICQDA&sqi=2&ved=0CCkQsAQ&biw=1034&bih=575>
8. Estructura de la celulosa.[En línea].Recuperado el 29 de noviembre del 2013 de https://www.google.com/search?q=estructura+de+la+celulosa&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=rSaeUunyFJKgkQfkk4CgBw&ved=0CDMQsAQ&biw=1366&bih=622#facrc=&imgdii=&imgrc=0DECnKCwVt0lwM%3A%3BF9Q21euEXeaWYM%3Bhttp%25A%25F%25Fwww.biologia.edu.ar%25Fimages%25Fcelulosa.gif%3Bhttp%25A%25F%25Fwww.biologia.edu.ar%25Fplantas%25Fcell_vegetal.htm%3B435%3B197
9. Estructura de la silica gel.[En línea]._Recuperado el 29 de noviembre del 2013 de <https://www.google.com/search?q=silica+gel+estructura+molecular&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=KSmeUrzTNozokAfa5oDYAw&ved=0CFMQsAQ&biw=1366&bih=622>



10. Estructura química del óxido de aluminio. [En línea]. Recuperado el 29 de noviembre del 2013 de <https://www.google.com/search?q=estructura+quimica+del+oxido+de+aluminio&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=cSqeUqnoF4LekQfYgIGoBQ&ved=0CFQQsAQ&biw=1366&bih=622>
11. Instituto de Tecnología ORT. Capacitación Cromatografía. [En Línea]. Argentina. Revisado el día 14 de octubre del 2013 de <http://campus.ort.edu.ar/articulo/167562/diapositivas-cromatograf-a>
12. M. Pahlow (1979). El Gran Libro de las Plantas Medicinales.[Libro].Tercera Edición. España. EVEREST, S.A. pág. (380,381).
13. N. Solis P., Guerrero .S N., Gattuso S. & Cáceres A. (S.F). Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapeuticos. [Libro]. Pág. (47,48).
14. The Free Encyclopedia Wikipedia. Gingerol. Recuperado el 14 de septiembre del 2013 de: <http://en.wikipedia.org/wiki/Gingerol>
15. Textos científicos. (2007). Consideraciones teóricas y parámetros cromatograficos. [En línea].Recuperado el 14 de octubre del 2013 de <http://www.textoscienficos.com/quimica/cromatografia/parametros>.



ANEXOS



Anexo 1 Tabla N. 3 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Mar	Ab r	Ma y	Jun	Jul	Agos	Sept	Oct	Nov
Recolección de información para realización del protocolo de investigación.	X	X							
Realización de Protocolo de Investigación			X	X	X	X	X		
Entrega del Protocolo de Investigación								X	
Preparación de las Muestras e Extractos inclusive								X	
Parte Experimental (Ensayo)								X	
Obtención de resultados y Procesamientos									X
Entrega de informe final									X



Anexo 2 Tabla N°4 **Evaluación Técnica**
Recomendaciones de la RTCA 11.03.56.09
Pruebas físicas, químicas y microbiológicas

Forma Farmacéutica	Pruebas
Soluciones, Suspensiones y Emulsiones	<ul style="list-style-type: none">✓ Características Organolépticas.✓ Volumen de entrega.✓ Ph.✓ Densidad.✓ Identificación general o específica.



Anexo 3 Tabla N°5 Índice de polaridad

Solvent	Refractive Index ^a	Viscosity, cP ^b	Boiling Point, °C	Polarity Index, P ^c	Eluent Strength, ε ^d
Fluoroalkanes ^d	1.27-1.29	0.4-2.6	50-174	<-2	-0.25
Cyclohexane	1.423	0.90	81	0.04	-0.2
n-Hexane	1.372	0.30	69	0.1	0.01
1-Chlorobutane	1.400	0.42	78	1.0	0.26
Carbon tetrachloride	1.457	0.90	77	1.6	0.18
i-Propyl ether	1.365	0.38	68	2.4	0.28
Toluene	1.494	0.55	110	2.4	0.29
Diethyl ether	1.350	0.24	35	2.8	0.38
Tetrahydrofuran	1.405	0.46	66	4.0	0.57
Chloroform	1.443	0.53	61	4.1	0.40
Ethanol	1.359	1.08	78	4.3	0.88
Ethyl acetate	1.370	0.43	77	4.4	0.58
Dioxane	1.420	1.2	101	4.8	0.56
Methanol	1.326	0.54	65	5.1	0.95
Acetonitrile	1.341	0.34	82	5.8	0.65
Nitromethane	1.380	0.61	101	6.0	0.64
Ethylene glycol	1.431	16.5	182	6.9	1.11
Water	1.333	0.89	100	10.2	Large

^aAt 25°C.

^bThe centipoise is a common unit of viscosity; in SI units, 1 cP = 1 mN · s · m⁻².

^cOn Al₂O₃. Multiplication by 0.8 gives ε^d on SiO₂.

^dProperties depend upon molecular weight. Range of data given.