

Estabilidad por cromatografía en capa delgada de mezclas de tinturas de *Quassia amara* y *Maytenus ilicifolia*

Stability by thin-layer chromatography from *Quassia amara* and *Maytenus ilicifolia* tinctures

Eneyda Sieres Pedraja^I; Olga María Nieto Acosta^{II}

^ILicenciada en Biología. Máster en Tecnología y Control de los Medicamentos. Aspirante a Investigador. Instructor. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{II}Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Licenciada en Química. Profesora Titular. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Una línea de investigación que ha tomado auge en los últimos tiempos, es aquella que se refiere a los productos fitoterapéuticos, por lo que se hizo necesaria una evaluación integral para su posterior utilización. Este trabajo describe un método por cromatografía en capa delgada, para evaluar la estabilidad de tinturas obtenidas a partir de un proceso de percolación de 2 plantas de origen brasileño: *Quassia amara* y *Maytenus ilicifolia*. El estudio se realizó teniendo en cuenta 3 temperaturas de almacenamiento: refrigeración, ambiente y 40 °C, durante un tiempo de 90 días. Se seleccionaron las condiciones cromatográficas, se determinó el límite de detección y se demostró la selectividad del método, para lo cual se sometió el extracto a 4 condiciones de estrés. Se usó como fase móvil n-butanol-acido acético-agua (4:1:5) y como revelador la luz ultravioleta a una λ de 366 nm. Los mejores resultados se observan cuando el extracto analizado se conserva en refrigeración durante el tiempo de estudio. Bajo condiciones de estrés, solo existen resultados favorables cuando es expuesto a la luz ultravioleta. Se establece como límite de detección el correspondiente a 7 μ L.

Palabras clave: Estabilidad, cromatografía en capa delgada, límite de detección, condiciones de estrés, almacenamiento.

ABSTRACT

In past years, a research field with boom is that related to phytotherapeutical products, being necessary an integral research for its latter utilization. Present paper describes a thin layer chromatography (TLC) method to assess the stability of tinctures obtained from a percolation process of two Brazilian plants: *Quassia amara* and *Maytenus ilicifolia*. Study took into account three storage temperatures: refrigeration, room-temperature and at 40 °C during 90 days. Chromatographic conditions were selected, detection limit was determined, and method selectivity was demonstrated where the extract undergoes four stress-conditions. As a mobile phase we used n-butanol-acetic acid-water (4:1:5), and as UV at a λ of 366 nm. The better results are obtained when analyzed extract is stored in refrigeration during study-time. Under stress-conditions only it is possible to obtain favorable results under UV. Detection limit is that corresponding to 7 μ L.

Key words: Stability, thin layer chromatography, detection limit, stress conditions, storage.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las técnicas de análisis para el control de calidad de un producto fitoterapéutico, se encuentra la cromatografía en capa fina, la cual es importante en todo proceso ya que permite proporcionar información sobre la homogeneidad de los componentes químicos de los productos y así garantizar que las sustancias responsables de la actividad farmacológica estén presentes en niveles adecuados.¹

El primer paso para realizar un análisis a un fitofármaco, es definir las sustancias químicas que van a ser investigadas, lo que permitirá seleccionar cuál es el mejor solvente para extraer dichas sustancias, así como determinar el mejor sistema de eluentes para la migración en las cromatoplasmas e identificar los reveladores más adecuados para detectar las sustancias presentes.²

Este trabajo describe un método por cromatografía en capa delgada (CCD), para evaluar la estabilidad de 3 tinturas, obtenidas a partir de un proceso de percolación de 2 plantas de origen brasileño: *Quassia amara* y *Maytenus ilicifolia*.³

Se seleccionaron las condiciones cromatográficas para determinar el límite de detección y se demostró la selectividad del método, sometiendo el extracto a 4 condiciones de estrés.

MÉTODOS

Desarrollo del método

Para evaluar el comportamiento de las tinturas A, B y D (presencia de sus componentes) en el tiempo,³ en las diferentes condiciones de almacenamiento (3 temperaturas diferentes), fue necesario desarrollar un método por CCD.

Selección de las condiciones cromatográficas

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254 (20 x 20)

Fase móvil: se evaluaron 5 sistemas de solventes como fase móvil:

1. Cloroformo-metanol (9:1).
2. n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5).
3. n-butanol-amoniaco-agua (4:1:5).
4. Acetato de etilo-metanol-agua (100:16,5:13,5).
5. Isopropanol-ácido acético-agua (70:15:15).

Como revelador se usó luz UV con 2 longitudes de onda diferentes: 254 y 366 nm.

Procedimiento

1. Se aplicaron 10 µL de las tinturas A, B y D respectivamente (esta última en sus 3 condiciones de almacenamiento).
2. Se dejaron secar las manchas.
3. Se introdujo la placa en la cámara cromatográfica previamente saturada.
4. Se dejó ascender la fase móvil hasta que alcanzó las tres cuartas partes de la altura de la placa.
6. Se extrajo la placa y se marcó el frente de solvente y se dejó secar.

Se expuso la placa a la luz UV, se visualizaron las manchas. Se marcaron las zonas, se calcularon los Rf.

Esta operación se hizo bajo campana y a temperatura ambiente.

Se tomó como criterio de selección los valores obtenidos en los Rf y se estableció el mejor sistema de solventes; las mayores diferencias de este parámetro se mostraron en el sistema que fue seleccionado. Además se consideró la forma e intensidad de las manchas.²

Selectividad del método

El estudio se realizó paralelamente con el empleo muestras de tinturas A, B y D; aplicaron en la misma cromatoplaqueta 10 µL de las tinturas degradadas y sin degradar. Se utilizó como fase móvil n-butanol-ácido acético- agua (4:1:5) y revelador luz UV a 336 nm.⁴

Las matrices fueron sometidas a las siguientes condiciones degradativas:

- Luz UV: 10 mL
- Oxidación: 10 mL más 10 mL de H₂O₂ 30 %
- Hidrólisis básica: 10 mL más 10 mL de solución de NaOH 1 N
- Hidrólisis ácida: 10 mL más 10 mL de solución de HCl 1 N

El tiempo máximo de exposición de las muestras fue de 2 h.

Criterio: Se escogió el sistema que lograra mejor resolución entre las manchas, estimado por los valores de Rf.

Límite de detección (Ld)

Se aplicó en una cromatoplaaca diferentes volúmenes de tintura: 25, 20, 15, 10, 7, 5, 2, 1 µL respectivamente. Posteriormente se determinó el menor nivel de concentración detectado para la tintura.²

RESULTADOS

En la [tabla 1](#) la mejor resolución se obtuvo para el sistema de solventes 2: n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5), ya que aunque al igual que para el sistema 1, permite separar 4 manchas bien definidas para la tintura de *Maytenus ilicifolia* que posee una mayor complejidad, por la cantidad de metabolitos presentes en la muestra,^{5,6} los valores de Rf están más distantes entre las manchas 1 y 2.

Tabla 1. Resultados del desarrollo del método por CCD. Selección de la fase móvil y el revelador

Fase móvil	<i>Quassia amara</i>		<i>Maythenus ilicifolia</i>	
	254 nm	366 nm	254 nm	366 nm
1. Cloroformo-metanol (9:1)	-	Rf1= 0,52	-	Rf1= 0,30 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74
2. n butanol-ácido acético-agua (4:1:5)	-	Rf1= 0,79	Mancha con cola	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74
3. Isopropanol-ácido acético-agua (70:15:15)	-	Rf1= 0,82	-	Rf1= 0,91 Rf2= 0,95 Rf3= 0,97
4. n-butanol-amoníaco-agua 4:1:5)	-	Rf1= 0,70	Rf1= 0,35 Rf= 0, 69	-
5. acetato de etilo-metanol-agua (70:16,5:16,5)	-	Rf1= 0,86	No se separa	-

En la tintura de *Quassia amara* en todos los sistemas se detecta una mancha única con adecuado corrimiento y un comportamiento esperado.⁷ Para ambas tinturas los mejores resultados fueron para el revelador a 366 nm.

Teniendo en cuenta estos elementos se decidió proseguir el estudio con el sistema 2 y revelador luz UV a 366 nm (Sieres Pedraja E. Tesis en Opción de Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. 2005).

Para la selectividad del método se sometieron las tinturas A, B y D a 4 variantes de estrés luz UV-oxidación-hidrólisis básica y ácida) y se estudiaron conjuntamente en la misma cromatoplaca, con la aplicación de 10 µL de cada tintura y donde se utilizaron las condiciones cromatográficas antes seleccionadas, con tiempo de exposición de 2 h en cada caso ([tabla 2](#)).

Tabla 2. Resultados de la selectividad del método por CCD aplicado a las tinturas A, B y D sometidas a condiciones degradativas

Condición evaluada	Manchas detectadas		
	A	B	D
Luz UV	Rf1= 0,79	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74 Rf5= 0,79
Oxidación	-	-	-
Hidrólisis básica	Rf1= 0,79 Rf2= 0,96	Rf1= 0,45 con cola Rf2= 0,52 Rf3= 0,65 con cola	Rf1= 0,45 con cola Rf2= 0,52 Rf3= 0,65 con cola Rf4= 0,79 Rf5= 0,96
Hidrólisis ácida	Rf1= 0,79 Rf2= 0,96	Rf1=0,44 con cola Rf2= 0,53 Rf3= 0,70 con cola	Rf1= 0,45 con cola Rf2= 0,52 Rf3= 0,68 con cola Rf4= 0,79 Rf5= 0,96

Las tablas [3](#), [4](#) y [5](#) muestran el comportamiento cromatografico de las tinturas en estudio durante 90 días y a 3 temperaturas diferentes (Sieres Pedraja E. Tesis en Opción de Máster en Tecnología y Control de Medicamentos, 2005).

Tabla 3. Resultados de la CCD para temperatura ambiente

Tintura	30 días		
	A	B	D
Resultados	Rf1= 0,79	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74 Rf5= 0,79
60 días			
Resultados	Rf1= 0,79	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74 Rf5= 0,79
90 días			
Resultados	Rf1= 0,79 Rf2= 0,96	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74 Rf5= 0,79 Rf6= 0,96

Tabla 4. Resultados de la CCD para temperatura de refrigeración

Tintura	30 días		
	A	B	D
Resultados	Rf1= 0,79	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74 Rf5= 0,79
60 días			
Resultados	Rf1= 0,79	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74 Rf5= 0,79
90 días			
Resultados	Rf1= 0,79	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,74 Rf5= 0,79

Tabla 5. Resultados de la CCD para 40 °C

Tintura	30 días		
	A	B	D
Resultados	Rf1= 0,79 Rf2= 0,96	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,60 con cola	Rf1= 0,19 Rf2= 0,40 Rf3= 0,52 Rf4= 0,60 con cola Rf5= 0,80 Rf6= 0,96
60 días			
Resultados	Rf1= 0,79 con cola Rf2= 0,96	Rf1= 0,39 con cola Rf2= 0,52 Rf3= 0,60 con cola alargada	Rf1= 0,41 con cola Rf2= 0,49 Rf4= 0,62 con cola Rf5= 0,86 con cola
90 días			
Resultados	Rf1= 0,89 con cola alargada	Rf2= 0,52 con cola muy alargada que llega al punto de aplicación	Rf2= 0,60 con cola muy alargada que llega al punto de aplicación y practicante al frente de solvente

DISCUSIÓN

Para el desarrollo del estudio y teniendo en cuenta los valores de Rf ([tabla 1](#)) y la buena resolución obtenida es que se decide seguir el estudio con el sistema de solventes 2, ya que al igual que el sistema 1, permite separar 4 manchas bien definidas para la tintura de *Maytenus ilicifolia* que es más compleja;⁵ los valores de Rf están más distantes entre la mancha 1 y 2.

En el caso de la tintura de *Quassia amara* se observa una única mancha con corrimiento adecuado según reportes de la literatura consultada.⁷

Se comprobó que las tinturas no fueron degradadas por efecto de la luz UV ([tabla 2](#)), ya que se visualizaron las mismas manchas observadas para A y B (QA y MI), respectivamente, que se tomaron como referencia por no disponer de sustancias patrones, en la etapa de desarrollo del método, en las que no se aplicó ninguna degradación. Para la tintura D se observaron las manchas provenientes de A y B.

El medio oxidante aplicado fue una condición extremadamente drástica, para lo cual no fue posible visualizar mancha alguna, resultado que apunta hacia la total degradación de los componentes de las tinturas. Sin embargo, hubiera sido de gran utilidad muestrear a intervalos menores de exposición con el objetivo de evaluar la selectividad del método frente a posibles productos de degradación por vía oxidativa (Costa Acosta CJ. Tesis en Opción de Master en Tecnología y control de los Medicamentos. 2002).

Las hidrólisis catalizadas en medio ácido y alcalino permitieron obtener posibles productos de degradación. Por la complejidad de estas tinturas, el método por CCD presentó algunas limitaciones. Sin embargo, se comprobó una adecuada selectividad de este, ya que exceptuando dos pequeñas colas asociadas a la

segunda y última mancha de la tintura B que persistieron en D, no se apreciaron interferencias entre los componentes que se presentaron individualmente en A y B, en la misma D. No se observó la primera mancha de la tintura B con respecto al tiempo cero, es decir, respecto a los resultados que aparecen en la (tabla 2). Las tablas 3, 4 y 5 presentan el estudio de estabilidad realizado con la aplicación del método por CCD a las muestras almacenadas a las 3 condiciones: ambiente, refrigeración y 40 °C.

A temperatura ambiente la tintura D se mantuvo estable hasta los 3 meses con respecto a *Quassia amara*, a partir de este momento se observó una mancha secundaria. Sin embargo, se mantuvo inalterada con respecto a *Maytenus ilicifolia*, ya que persistieron durante todo el tiempo, las 4 manchas observadas a tiempo cero (tabla 3).

En refrigeración las tinturas no mostraron signos de degradación química, pues todos los resultados coincidieron con los observados para tiempo cero (tabla 4).

A 40 °C desde los 30 días se registraron colas y/o manchas secundarias en las tinturas, atribuidas a posibles productos de degradación (tabla 5). Este resultado es de gran importancia, ya que demuestra la necesidad de proteger el producto de elevadas temperaturas de almacenamiento (Sieres Pedraja E. Tesis en Opción de Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. 2005).

Límite de detección

La evaluación realizada permitió seleccionar el volumen de 7 µL como la menor alícuota detectada. Esta cantidad equivale aproximadamente a 1,4 µg, lo cual se considera un nivel suficiente de sensibilidad de acuerdo con el objetivo del estudio.²

En conclusión, los mejores resultados se obtuvieron para la temperatura de refrigeración en correspondencia con la estabilidad química. Se debe resaltar el mantenimiento a valores similares del contenido de sólidos totales; el contenido alcohólico muestra una ligera disminución, por lo que fue necesario el uso de retapas para garantizar la hermeticidad del envase y así evitar pérdidas de material vegetal en estudio, ya que también puede influir la manipulación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castiñeira M. Control de medicamentos I. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1986. p. 220-4.
2. González San Miguel HM. Curso de Validación de Métodos Analíticos. La Habana: IFAL-UH; 2002. p. 32-43.
3. Sieres Pedraja E, Nieto Acosta OM, González San Miguel HM. Evaluación de propiedades físico- químicas de tinturas de *Quassia amara* y *Maytenus ilicifolia*. Rev Cubana Farm 2009; 43(4). (En prensa).
4. Pachaly P. Simple Thin-layer Chromatographic Identification of Active Ingredients in Essential Drugs. Munich: Gesundheitshilfe Dritte Welt; 1994. p. 25-6.

5. Cruz GL. Diccionario de plantas útiles de Brasil. 2da. ed. Río de Janeiro: Beltrand; 1983. p. 335.

6. Sharapin N. Materias primas vegetales para al industria de productos fitoterapéuticos. Santa Fé de Bogotá: CYTED; 2000. p. 7- 8.

7. Valenta Z. Ryanodine and Quassin. Congreso Internacional de pesticidas químicos. 2da ed. Tel- Aviv: TOPAC; 1971. p. 191-205.

Recibido: 16 de julio de 2009.

Aprobado: 20 de agosto de 2009.

Lic. *Eneyda Sieres Pedraja*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ave 23 No. 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, municipio La Lisa, La Habana, Cuba.