



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Farmacia

Desarrollo de un método de valoración de
polvo de Cáscara Sagrada y jugo de Aloe en
cápsulas

N° 532

Guillermo Costa

Tutora: Dra. Erica Georgina Wilson

Departamento de Investigaciones
Setiembre 2012

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

Agradecimientos

A Erica Wilson por guiarme durante el desarrollo de este trabajo y brindarme siempre su confianza y paciencia.

A Juan Blanes por los favores concedidos a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A Silvia De Benedetti y a Hernán Aldana Marcos por toda su ayuda a lo largo de mi carrera.

A todo el claustro docente de la carrera de farmacia.

A mis compañeros de cursada.

A mi familia.

A mis amigos.

Y a Karinisha.

Índice

1 - Resumen	7
2 - Introducción.....	7
3 - Drogas vegetales	8
3.1 - Aloe	8
3.1.1 - Descripción botánica.....	8
3.1.2 - Composición química.....	9
3.2 - Cáscara Sagrada	10
3.2.1 - Descripción botánica.....	10
3.2.2 - Composición química.....	11
3.3 - Propiedades físico-químicas de los derivados hidroxiantracénicos.....	12
3.4 - Actividades farmacológicas.....	12
4 - Valoración espectrofotométrica de Aloe y Cáscara Sagrada como materia prima	13
4.1 - Materiales.....	13
4.2 - Esquema de valoración Farmacopea Británica 2007: Cáscara Sagrada (modificado)	13
4.3 - Esquema de valoración Farmacopea Británica 2007: Aloe (modificado)	15
4.4 - Resultados	16
4.5 - Discusión.....	16
5 - HPLC: Desarrollo del método.....	16
5.1 - Fundamento del método	16
5.2 - Materiales y métodos	16
5.2.1 - Materiales	16
5.2.2 - Soluciones	17
5.2.3 - Método	17
5.3 - Identificación del marcador de Aloe:	17
5.4 - Identificación del marcador de Cáscara Sagrada	18
5.4.1 - Materiales y métodos.....	18
5.4.2 - Preparación del extracto Cáscara Sagrada:	18
5.5 - Resultados y Discusión	18
6 - Validación del método analítico.....	21
6.1 - Linealidad.....	21
6.1.1 - Cáscara Sagrada: Preparación de los extractos	21
6.1.2 - Aloe: Extractos	24
6.2 - Exactitud	27
6.2.1 - Recuperación.....	27
6.2.2 - Linealidad de recuperación.....	27
6.3 - Especificidad.....	29
7 - Cuantificación de Cáscara Sagrada y Aloe en cápsulas.....	30
7.1 - Preparación de soluciones:.....	30
7.1.1 - Fase móvil.....	30
7.1.2 - Solvente de dilución.....	30
7.1.3 - Solución testigo.....	30
7.1.4 - Solución muestra	30
7.2 - Procedimiento	30
7.3 - Cálculos	30
8 - Conclusión	31
9 - Referencias bibliográficas y material de consulta	31

1 - Resumen

El siguiente trabajo presenta el desarrollo de un método de valoración de polvo de Cáscara Sagrada y jugo de Aloe en cápsulas.

En primera instancia se valoraron las materias primas (jugo de *Aloe spp.* y Cáscara Sagrada) utilizando los métodos espectrofotométricos de la Farmacopea Británica 2007 (BP 2007). Luego se analizó la factibilidad de aplicar el método de Cáscara Sagrada para la valoración de la misma en el producto terminado considerando que la cantidad de aloinósidos (C- y O-glicósidos provenientes de Aloe) era despreciable con respecto a los cascarósidos (O- y C- heterósidos provenientes de Cáscara Sagrada), calculando luego la cantidad de Aloe por diferencia.

Al no ser posible, se desarrolló un método por HPLC en fase reversa que utiliza un gradiente de elución de 35 minutos con ácido acético 1% como solvente A y metanol con ácido acético 1% como solvente B en columna C18 de 150 x 46 mm.

El Aloe se cuantificó utilizando aloína (A/B) que se comercializa como sustancia de referencia. En el caso de Cáscara, al no haber disponible en el mercado cascarósidos puros, se los aisló por TLC.

Se validaron los parámetros de linealidad, exactitud y especificidad.

2 - Introducción

Para garantizar la eficacia y seguridad de un medicamento fitoterápico es necesario poder contar con métodos de control de calidad que permitan verificar la identidad y cantidad de las drogas vegetales presentes en dichos fármacos.

Los métodos utilizados para la valoración de drogas vegetales varían de acuerdo al tipo de compuestos y la actividad biológica de los mismos. En el caso que se describe en esta tesina, el fitoterápico a valorar son cápsulas que contienen 100mg de jugo de Aloe desecado y 150 mg de Cáscara Sagrada como activos.

Tanto el Aloe como la Cáscara Sagrada son drogas con actividad catártica debido a la presencia de antraquinonas (Bruneton 2001). Las antraquinonas son derivados hidroxiantracénicos que se encuentran, en general, mono o diglicosidados, aunque también puede haber cantidades mínimas de aglucones, producto de la hidrólisis de estos glicósidos (aún cuando la droga haya sido bien conservada). Como la actividad catártica o purgante se debe al aglucón antraquinónico, todas las antraquinonas tienen actividad independientemente de su grado de glicosidación. Debido a esto, las monografías farmacopéicas de estas drogas definen el contenido de derivados hidroxiantracénicos, incluyendo todo tipo de glicósidos, no así los aglucones que son productos de degradación de los mismos. Estas drogas vegetales tienen varios glicósidos diferentes, de los cuales solo algunos se han identificado. Esto implica una dificultad obvia ya que es imposible cuantificar cada compuesto por separado, ya sea porque algunos están en cantidades muy bajas o inclusive puede ser que no se hayan identificado aún o porque no existen sustancias de referencia de cada uno de ellos. Una solución posible es utilizar un método de valoración capaz de detectar indiscriminadamente todos los compuestos con núcleo antraquinónico, como podría ser un método espectrofotométrico.

Sin embargo, para esto se debe diseñar un procedimiento que asegure la extracción de todos los compuestos evitando asimismo la extracción de otros componentes que puedan interferir en la valoración de los derivados hidroxiantracénicos. El grado de glicosidación de las antraquinonas incide en primer lugar en su solubilidad pero además plantea una gran dificultad para calcular la correspondencia entre aglucones/heterósidos a la hora de estandarizar drogas vegetales. Por este motivo, se calcula por separado el contenido en diglicósidos y monoglicósidos, previa hidrólisis de todos los heterósidos y posterior valoración de los aglucones resultantes. Una fórmula que contempla el tipo de heterósido valorado permite convertir el dato de contenido de aglucones en heterósidos.

Tanto Cáscara Sagrada como Aloe están codificados en la Farmacopea Europea (Ph.E 7th. ed.) y en la USP, aunque en esta última sólo se describe un método de valoración para Cáscara Sagrada. En la Farmacopea Argentina 8va Ed. está codificada sólo la Cáscara Sagrada. En todos los casos en la Cáscara Sagrada se valoran por separado cascarósidos (diglicósidos) y derivados hidroxiantracénicos distintos de cascarósidos. La Farmacopea Europea indica sólo la valoración de derivados hidroxiantracénicos calculados como aloína en Aloe.

Al encarar la valoración de una droga vegetal en un fitoterápico, es razonable intentar aplicar el mismo método empleado para la valoración de la potencia en la materia prima. Por lo tanto, para determinar la aplicabilidad de estos métodos de valoración de materia prima al producto terminado, se aplicaron

ambos métodos a las drogas vegetales por separado con el fin de evaluar el grado de interferencia que podían tener.

En primera instancia se analizó la factibilidad de aplicar el método de Cáscara Sagrada para la valoración de la misma en el producto terminado considerando que en la Cáscara Sagrada la cantidad de aloinósidos (C- y O-glicósidos provenientes de Aloe) podría ser despreciable con respecto a los cascarósidos (O- y C- heterósidos provenientes de Cáscara Sagrada). Si así fuera, sería posible calcular la cantidad de Aloe presente por diferencia en la cantidad de derivados hidroxiantracénicos detectados al valorarlos utilizando el método de Aloe. Como resultado se determinó que la cantidad de aloinósidos presentes en Cáscara no era despreciable con respecto a sus cascarósidos.

Fue necesario, por lo tanto buscar otro método que permitiera valorar los activos del producto terminado. Se decidió utilizar cromatografía líquida de alta performance (HPLC) debido a su alta resolución y especificidad.

Se desarrolló un método con elución por gradiente que permite determinar los activos en una misma corrida. Dado el amplio rango de aceptabilidad de activos en drogas vegetales, se utiliza la misma materia prima presente en el producto terminado como referencia para su valoración. Al analizar una droga vegetal por HPLC, es habitual identificar uno o más marcadores para valorar cada materia prima en el medicamento. Estos marcadores deben ser específicos para cada componente del producto terminado y si fuera posible deberían estar vinculados con la actividad de la droga. Por otra parte, es deseable que sean compuestos que se puedan adquirir fácilmente y con bajo costo, como sustancias de referencia. En el caso del Aloe, se eligió la denominada aloína o barbaloina (una mezcla de los isómeros aloína A/ B), ya que está disponible comercialmente y además se determinó que si bien estas aloínas también están presentes en Cáscara Sagrada, están en una concentración despreciable. Para Cáscara Sagrada, los compuestos más relacionados con su actividad biológica son los cascarósidos A, B, C y D. Sin embargo, ninguno de ellos está disponible comercialmente. Por lo tanto se aislaron por TLC.

El siguiente trabajo presenta el desarrollo del método de valoración para cápsulas mezcla de jugo de *Aloe spp.* desecado 100 mg y Cáscara Sagrada 150 mg utilizando cromatografía líquida de alta performance.

3 - Drogas vegetales

3.1 - Aloe

El laboratorio declara en su monografía que emplea *Aloe spp.*

La Farmacopea Británica 2007 (BP2007) tiene codificada 2 especies de Aloe.

Aloe de Barbados:

Aloe barbadensis consiste en el jugo concentrado desecado de las hojas de *Aloe barbadensis* Miller. Contiene no menos de 28.0 por ciento de derivados hidroxiantracénicos expresados como barbaloina ($C_{21}H_{22}O_9$; M_r 418.4) y calculados como droga seca.

Aloe del Cabo:

Aloe del Cabo consiste en el jugo concentrado desecado de las hojas de varias especies de Aloe, principalmente *A. ferox* y sus híbridos. Contiene no menos de 18.0 por ciento de derivados hidroxiantracénicos expresados como barbaloina ($C_{21}H_{22}O_9$; M_r 418.4) y calculados como droga seca.

3.1.1 - Descripción botánica

Los aloes (existen más de 150 especies) son plantas de porte más o menos arborescente, de hojas gruesas y carnosas, generalmente con los bordes espinosos, reunidas en una roseta densa en la cima de un tronco robusto de longitud variable. En el caso de las especies oficiales, las flores, rojo escarlata cuando están en forma de botones (Aloes del Cabo) o amarillas (Aloe de los Barbados) se encuentran reunidas en densos racimos dispuestos sobre un escapo floral erguido, único (*A. barbadensis*) y ramificado (*A. ferox*).

Aloe ferox es originario del sur de África; se hibrida con facilidad y se cultiva. El *Aloe barbadensis*, es originario de África del norte e introducido desde el siglo XVII en las Antillas, se cultiva en la actualidad en los Estados Unidos (Florida).

Zumo de aloes y gel de aloes: La sección transversal de la hoja muestra, bajo la epidermis con cutícula muy espesa, un parénquima clorofílico y amilífero, una región central con células de mucílago y, entre ambos, los haces conductores aislados con periciclo y endodermo marcados. El zumo de aloes (el acíbar) se encuentra en las células pericíclicas y fluye espontáneamente de la hoja cortada mientras que el gel de aloes está constituido únicamente por el mucílago de las células poliédricas de la zona central.

Tradicionalmente se recoge el zumo que fluye espontáneamente de las hojas cortadas y se concentra por ebullición. El zumo concentrado se presenta en forma de masa marrón oscuro (acíbar de Barbados) con reflejos verdosos (acíbar del Cabo). El gel se obtiene después de eliminar los tejidos más externos de la hoja (Bruneton 2001).



Fig. 1: *Aloe vera*.
Missouri Botanical Garden.

3.1.2 - Composición química

Composición de los acíbares: la droga contiene entre un 15 y un 40% de derivados hidroxiantracénicos, que son C-glucósidos en C-10 del aloe-emodol antrona: aloína (=barbaloína), hidroxialoínas y, en *A. ferox*, aloinósido. La aloína ampliamente mayoritaria, es de hecho una mezcla de aloína A (10-R) y de aloína B (10-S) interconvertibles vía forma antranólica. Lo mismo ocurre para el aloinósido, derivado ramnosilado sobre el hidroximetilo en C-3 de la aloína A es característica de *A. ferox*, las 7-hidroxi-aloínas A y B y sus homólogos 8-O-metilados sólo se encuentran en *A. barbadensis* (que contiene asimismo 10-C-glicósidos 10-hidroxilados).

El zumo contiene también una fracción resinosa a partir de la cual se han aislado los

C-glucósidos en C-8 de 2-acetonil-7-hidroxi-5-metilcromonas: aloesina y aloeresina A. Estas cromonas mayoritarias (*A. ferox*) pueden ir acompañadas de pequeñas cantidades de derivados no C-glicosídicos, de nafto[2,3c]furanos y de 1-metiltetralinas. En *Aloe barbadensis*, se han caracterizado algunas 2-(2-hidroxipropil)-cromonas C-glucosiladas en C-8 (isoaloeresina D, derivadas del aloesol, aloediol, noreugenina, isorabaicromona, etc.). También se ha caracterizado, en *A. ferox* una tetralina libre y glicosilada, la feroxidina.

Composición del gel de aloe: muy rico en agua, no parece que contenga compuestos muy específicos: aminoácidos, lípidos, esteroides, enzimas y principalmente polisacáridos (pectinas, hemicelulosas) (Bruneton 2001).

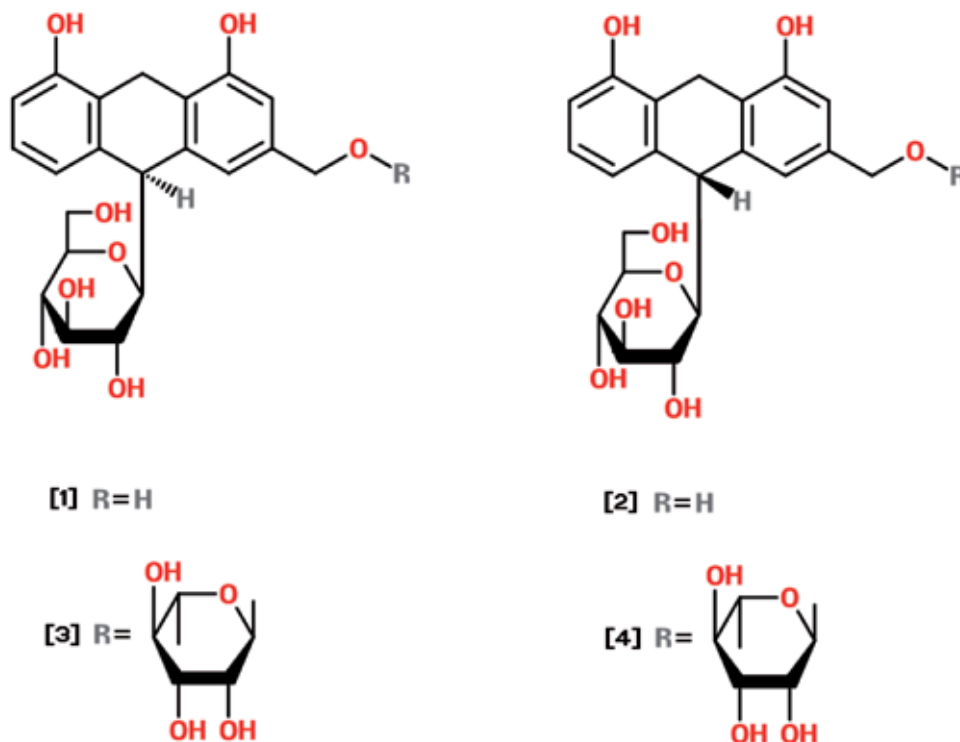


Fig. 2: [1] Aloína A ; [2] Aloína B ; [3] Aloinósido C ; [4] Aloinósido D.
WHO (1999).

3.2 - Cáscara Sagrada

La Farmacopea Argentina (8va Ed.) define a la Cáscara Sagrada como “la corteza desecada de *Rhamnus purshiana* D.C. (*Rhamnaceae*) recogida por lo menos un año antes de ser empleada con fines medicinales. Debe contener no menos de 7,0 por ciento de derivados de hidroxiantraceno totales, calculados como cascarósidos A, de los cuales no menos de 60 por ciento está constituido por cascarósidos A.”

Para la Farmacopea Británica (BP2007), la Cáscara “consiste en la corteza, entera o pulverizada de *Rhamnus purshiana* D.C. (*Frangula purshiana* (D.C.) A. Gray ex J. C. Cooper). Contiene no menos de 8.0 por ciento de glicósidos hidroxiantracénicos de los cuales no menos del 60% son cascarósidos, ambos expresados como cascarósido A ($C_{27}H_{32}O_{14}$; M_r 580.5) y calculados como droga seca.”

3.2.1 - Descripción botánica

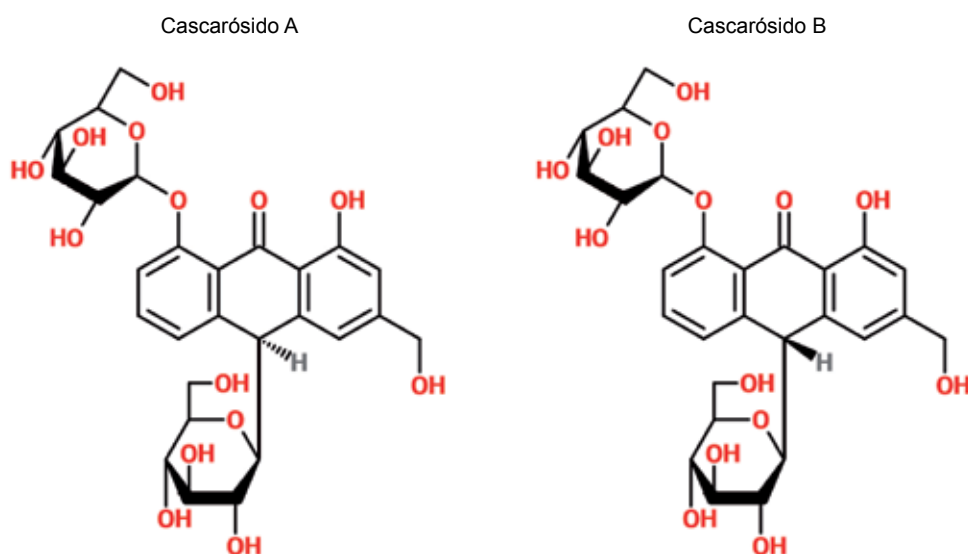
La Cáscara Sagrada es un árbol originario de la costa oeste de América del norte. La droga proviene de plantas espontáneas explotadas de las regiones montañosas del oeste de Estados Unidos y de Canadá. La recolección se inicia en mayo y prosigue hasta finales del verano. Las cortezas, cortadas en pequeños fragmentos, se conservan mucho tiempo antes de su utilización.

Lo droga se presenta en fragmentos bastante gruesos (hasta de 5 mm) con la superficie externa salpicada con lenticelas poco frecuentes y habitualmente más o menos recubierta de líquenes, musgos y hepáticas. Al microscopio, la ausencia de células con mucílago y la presencia en el parénquima cortical y en el periciclo de las células esclerosas en grupos, así como la presencia de radios medulares anchos diferencian esta corteza de la de frángula (Bruneton 2001).

Fig. 3: Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana*).

3.2.2 - Composición química

La corteza de Cáscara Sagrada (droga seca) contiene 6-9% de heterósidos hidroxiantracénicos. Los constituyentes mayoritarios (70% y más) son O-heterósidos de C-heterósidos, los cascarósidos A, B, C y D. Estos compuestos son, respectivamente, los isómeros en C-10 de los 8-O- β -D-glucósidos de la aloína (=barbaloína) y de crisaloína. Están acompañados por los C-heterósidos correspondientes (que son sin duda productos de degradación de los cascarósidos): aloína (=barbaloína = C-glucósido en 10 del aloe-emodol antrona) y crisaloína (C-glucósido en C-10 del crisofanol antrona). También se encuentran O-heterósidos de antraquinonas y de diantronas (Bruneton 2001).



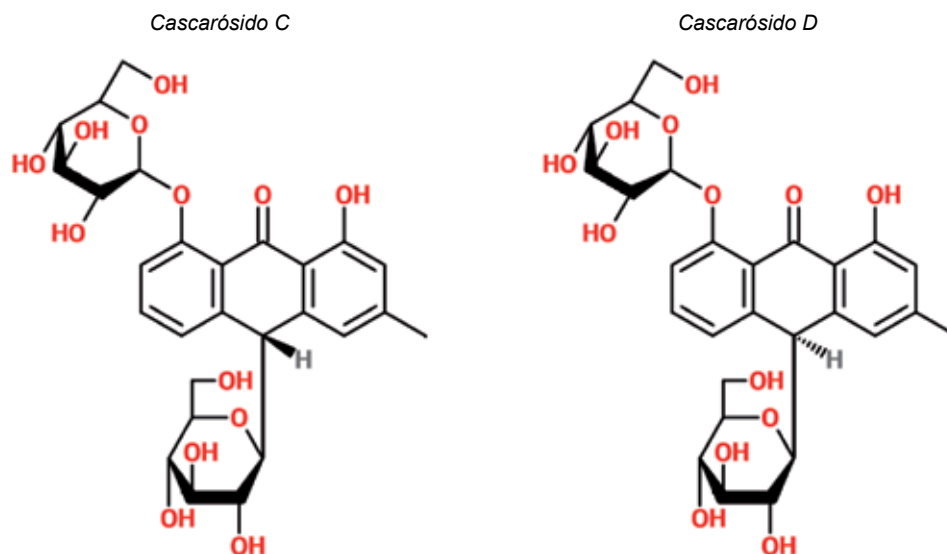


Fig. 4: (WHO, 2004).

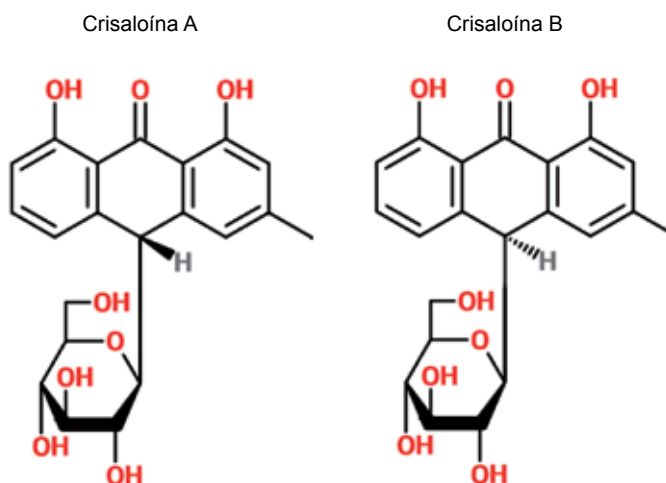


Fig. 5: (WHO, 2004).

3.3 - Propiedades físico-químicas de los derivados hidroxiantracénicos

Las antraquinonas son compuestos de color rojo anaranjado, muy poco solubles en agua fría, excepto en medio alcalino donde pierden los hidrógenos hidroxílicos y aumentan su solubilidad, solubles en agua caliente, solubles en disolventes orgánicos como acetato de etilo y alcoholes. Los diglicósidos (O- y C-heterósidos) son más solubles en agua que los monoglicósidos (O- o C-heterósidos).

Los O-heterósidos se hidrolizan en medio ácido fuerte, pero la ruptura del enlace carbono-carbono de los C-heterósidos no se puede efectuar más que en presencia de cloruro férrico.

3.4 - Actividades farmacológicas

Las drogas con derivados hidroxiantracénicos (antraquinonas) poseen acción laxante. Se denominan purgantes irritantes o de contacto debido a la irritación directa de la mucosa o la estimulación directa de los plexos nerviosos. Actúan fundamentalmente por inhibición de la absorción de electrolitos y agua desde la luz intestinal; de esta manera, aumentan el contenido de líquido intestinal y estimulan intensamente la peristalsis.

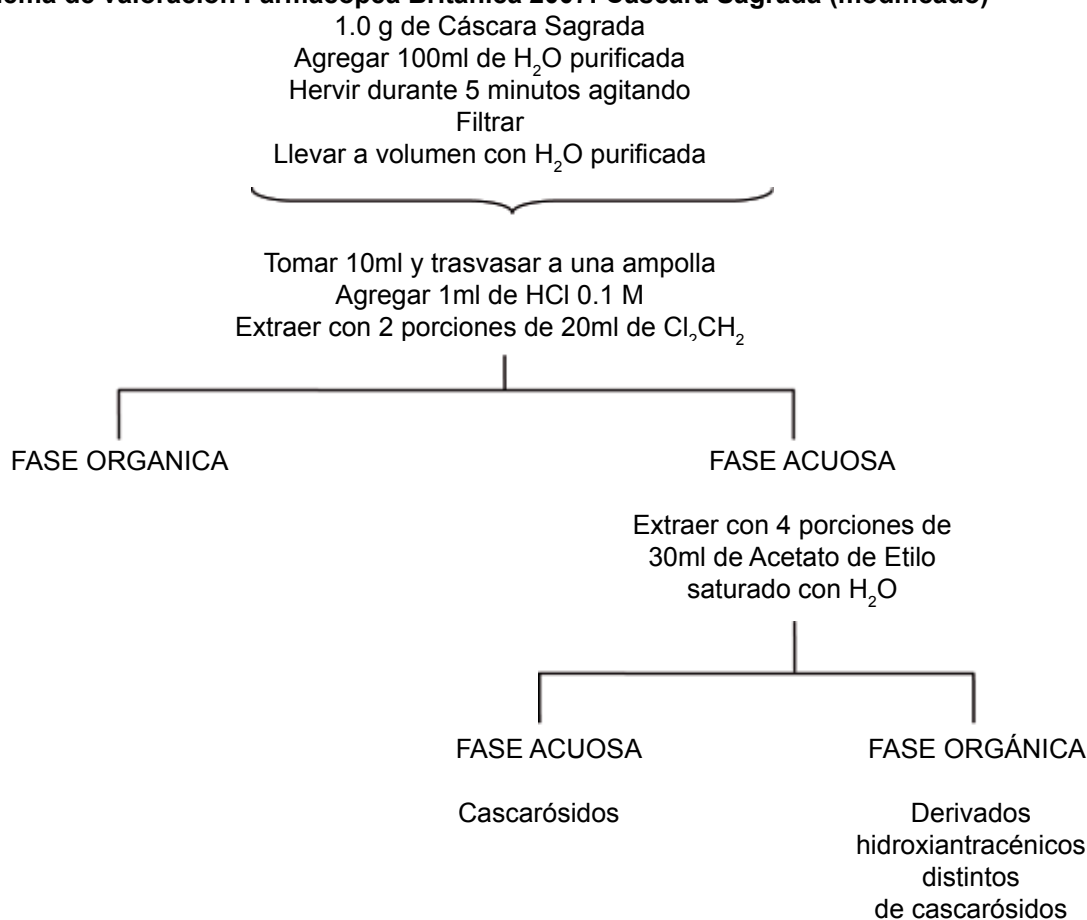
Como efecto colateral pueden generar molestias gastrointestinales, en forma de colitis espásticas, y alteraciones hidroelectrolíticas, como pérdida de potasio, depleción sódica, deshidratación, aldosteronismo secundario y cuadros de mala absorción (Flórez et al., 2008).

4 - Valoración espectrofotométrica de Aloe y Cáscara Sagrada como materia prima

4.1 - Materiales

- Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV1700 Pharmaspec
- Acetato de etilo, pa
- Ácido clorhídrico 37%, pa
- Diclorometano, pa
- Hierro (III), cloruro, hexahidratado, pa
- Magnesio, acetato, monohidrato pa
- Metanol calidad HPLC
- Sodio hidróxido, solución 1N
- Sodio, sulfato anhidro, pa

4.2 - Esquema de valoración Farmacopea Británica 2007: Cáscara Sagrada (modificado)



Cascarósidos

Llevar a 50ml con H₂O purificada
 Colocar 20ml de la solución en un balón
 Agregar 2g de FeCl₃ y 12ml de HCl concentrado
 Calentar a reflujo durante 4 horas
 Dejar enfriar y trasvasar a una ampolla de decantación
 Lavar el balón con 4ml de NaOH 1M y luego con 4ml de H₂O
 Agregar las aguas de lavado a la ampolla

AMPOLLA

Extraer con 3 porciones de
30ml de Cl_2CH_2

FASE ORGÁNICA

*Lavar la fase orgánica con
2 porciones de 20ml de H_2O
descartando las aguas de lavado*

Tomar 20ml

Llevar a sequedad

Disolver en 10ml de solución de Acetato
de Magnesio 5g/L

Medir absorbancia a 515nm

Medir absorbancia a 440nm

FASE ACUOSA**Derivados hidroxiantracénicos distintos de cascarósidos**

Llevar a sequedad y disolver en 0.5ml de metanol

Llevar a 50ml con H_2O purificada

Colocar 20ml de la solución en un balón

Agregar 2g de FeCl_3 y 12ml de HCl concentrado

Calentar a reflujo durante 4 horas

Dejar enfriar y trasvasar a una ampolla de decantación

Lavar el balón con 4ml de NaOH 1M y luego con 4ml de H_2O

Agregar las aguas de lavado a la ampolla

AMPOLLA

Extraer con 3 porciones de
30ml de Cl_2CH_2

FASE ORGÁNICA

*Lavar la fase orgánica con
2 porciones de 20ml de H_2O
descartando las aguas de lavado*

Tomar 20ml

Llevar a sequedad

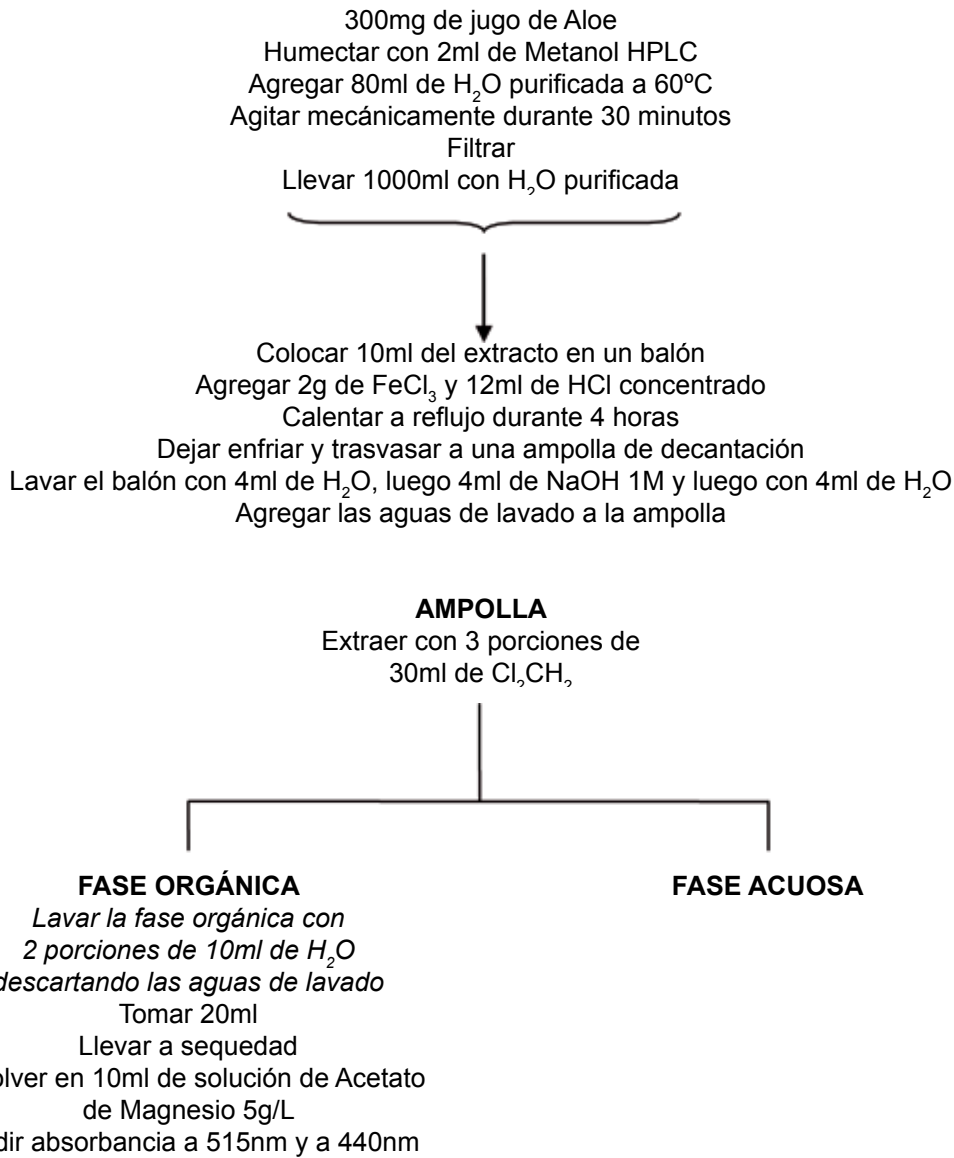
Disolver en 10ml de solución de
Acetato de Magnesio 5g/L

Medir absorbancia a 515nm

Medir absorbancia a 440nm

FASE ACUOSA

Calcular el contenido de cascarósidos como cascarósido A tomando 169 como valor de A (1%, 1cm).
El ensayo no será válido si no se cumple la relación $\text{Abs}_{515} / \text{Abs}_{440} \geq 2.7$.

4.3 - Esquema de valoración Farmacopea Británica 2007: Aloe (modificado)

Calcular el porcentaje de derivados hidroxiantracénicos como barbaloina utilizando la siguiente expresión:

$$(A \times 19.6) / m$$

Donde m es la masa de droga vegetal en gramos y A es la absorbancia medida a 215nm. El ensayo no será válido si no se cumple la relación $Abs_{515} / Abs_{440} \geq 2.7$.

4.4 - Resultados

MATERIA PRIMA

Método de la BP 2007 para Aloe

Aloe (derivados hidroxiantracénicos) = 12,05%

Cáscara Sagrada (derivados hidroxiantracénicos) = 8,97%

Método de la BP 2007 para Cáscara Sagrada

Cáscara Sagrada

Fase acuosa (cascarósidos) = 6,13%

Fase orgánica (derivados hidroxiantracénicos diferentes a cascarósidos) = 1,66%

Aloe

Fase acuosa = 4,44%

Fase orgánica = 8,34%

CÁPSULAS

Método de Cáscara Sagrada de la BP 2007

Fase orgánica = 2,50% (equivalente a 6,25 mg/cápsula)

Fase acuosa = 6,64% (equivalente a 16,60 mg/cápsula)

4.5 - Discusión

Al aplicar el ensayo de Cáscara Sagrada al Aloe, se observó que la cantidad de aloinósidos (4%) no era despreciable con respecto a cascarósidos, ya que de los 16.6 mg de derivados O-y C- heterósidos detectados por cápsula un 25% provenían del Aloe.

A partir de esto, se descartó la opción de valorar las cápsulas por espectrofotometría y se procedió al desarrollo de un método de HPLC que permitiera valorar compuestos característicos de cada materia prima.

5 - HPLC: Desarrollo del método

5.1 - Fundamento del método

El método de valoración consiste en la detección de picos correspondientes a marcadores de cada materia prima en los cromatogramas de solución muestra, y cuyas áreas se comparan con los detectados en las materias primas con las cuales fue producido el lote a analizar.

Para el caso de Aloe, se utilizó un standard de referencia de aloínas (mezcla de los isómeros A y B).

Al no existir en el mercado cascarósidos como sustancia de referencia, se aislaron por TLC y luego se eligió uno de ellos en el cromatograma del extracto de polvo de Cáscara.

Se determinó la concentración de Cáscara Sagrada y Aloe en las cápsulas por cuantificación del cascarósido de mayor tiempo de retención y de aloínas A/B respectivamente.

Se desarrolló y validó un método cromatográfico en fase reversa con gradiente de elución y detección a dos longitudes de onda (295nm para Aloe y 324nm para Cáscara) que permite la cuantificación simultánea de Cáscara sagrada y Aloe en las cápsulas utilizando como testigo la propia materia prima.

5.2 - Materiales y métodos

5.2.1 - Materiales

- Cromatógrafo: Shimadzu Prominence®
- Bomba cuaternaria LC-AT
- Horno de columna CTO-10ASVP
- Detector UV-VISIBLE con Arreglo de Diodos SPD-M 20 A
- Inyector Rheodyne 7125, con rulo de 20 µl
- Columna Phenomenex Gemini® C18 150 x 4.6 mm y 5µm

- Ácido acético pa (Baker)
- Metanol pa (Baker)
- Agua calidad HPLC
- Acetonitrilo, calidad HPLC
- Aloína A/B (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU - N° Cat. 1415-73-2)

5.2.2 - Soluciones

- Solvente A: Ácido acético 1%
- Solvente B: Metanol con 1% de ácido acético
- Solvente de dilución: agua : acetonitrilo (50:50)

5.2.3 - Método

La muestra se eluyó con un gradiente de elución de 35 minutos de duración:

Minutos	0	10	15	16	20	30	30,2	35
% B	30	65	70	95	95	95	30	30
% A	70	35	30	5	5	5	70	70

Tabla 1: Gradiente de Elución.

El volumen de inyección fue de 20µl, la temperatura de 30°C y la cuantificación se realizó a dos longitudes de onda (324nm para Cáscara y 295nm para Aloe).

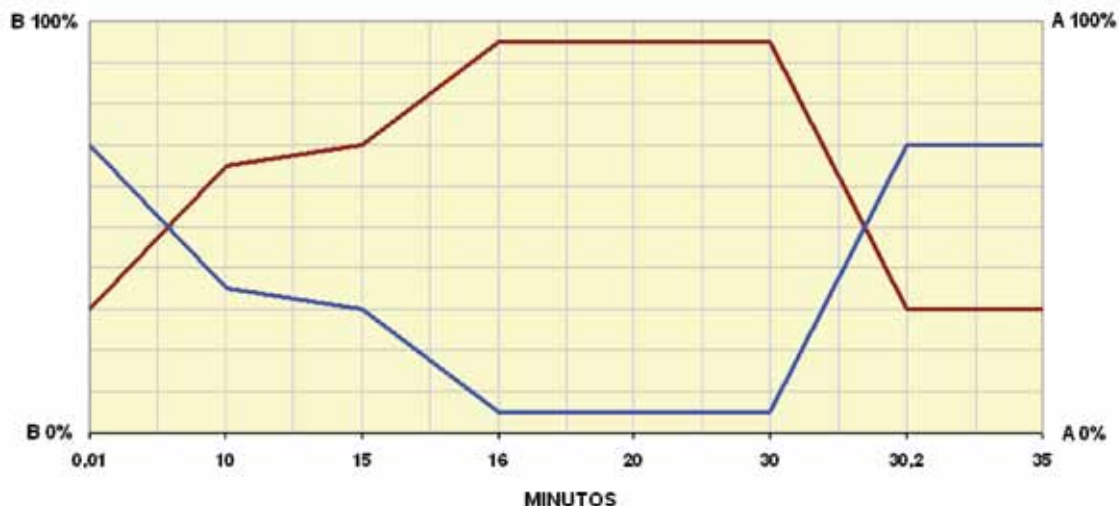


Fig. 6: Gráfico de gradiente.
Línea Roja: Concentración de A.
Línea azul: Concentración de B.

5.3 - Identificación del marcador de Aloe:

Se preparó una solución de 0,15mg/ml pesando 1,5mg de aloínas A/B sustancia de referencia y diluyendo a 10ml, en matraz aforado con solvente de dilución.

5.4 - Identificación del marcador de Cáscara Sagrada

Para identificar un pico correspondiente a un cascarósido para utilizar como marcador de Cáscara Sagrada se aislaron los cascarósidos C y D por TLC (Wagner et al., 1996).

5.4.1 - Materiales y métodos

- TLC sílica gel 60 F₂₅₄ de 20 x 20 cm Merck
- Agua destilada calidad HPLC
- Metanol pa, Sintorgan
- Acetato de etilo pa, Sintorgan
- Ácido acético glacial pa Merck (Darmstadt, Alemania)
- 2-aminoetil éster del ácido difenil bórico (Fluka, cat. 42810) (NPR)
- Lámpara UV @ 365nm
- Sonificador TestLab

5.4.2 - Preparación del extracto Cáscara Sagrada:

Se pesaron 0,500g de Cáscara Sagrada corteza seca pulverizada y se extrajeron con metanol a baño maría durante cinco minutos.

Se filtró y luego se sembró 1ml del extracto en banda en placa de TLC. Se eluyó con una fase móvil compuesta por acetato de etilo : metanol : agua : ácido acético glacial (100 : 13,5 : 10 : 1).

Se reveló con una solución 2% en metanol de NPR, tapando la parte central de la placa y luego se observó a 365nm. Se marcaron las bandas de interés ubicadas a Rf: 0.05-0.15 para cascarósidos A y B, y Rf: 0.2-0.25 para cascarósidos C y D.

Se recortaron las bandas correspondientes a Rf = 0.05; Rf = 0.15; Rf = 0.2 y Rf = 0.25, se colocaron en un tubo de ensayo con metanol : agua (50 : 50) y se sonicaron durante quince minutos. La suspensión obtenida se centrifugó y se llevó a 10mL con metanol : agua (50 : 50).

El sobrenadante se analizó por HPLC utilizando el método detallado en 5.1.2.

5.5 - Resultados y Discusión

Cascarósidos

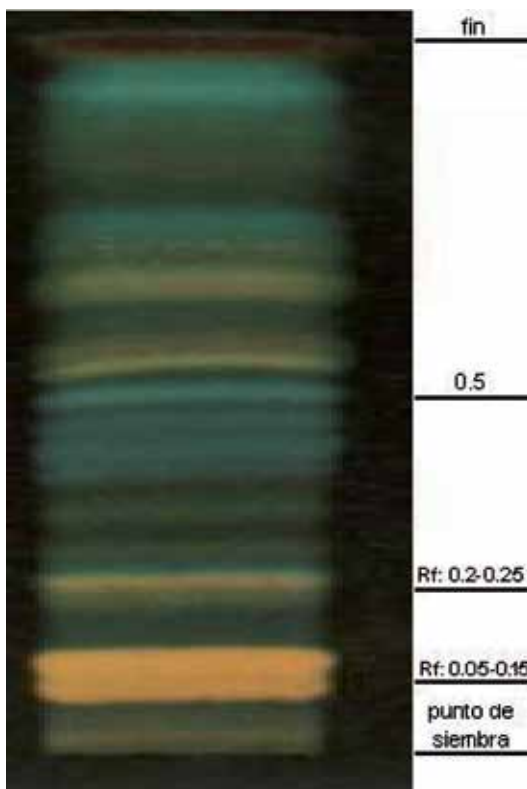


Fig. 7: TLC Cáscara Sagrada (Wagner et al., 1996).

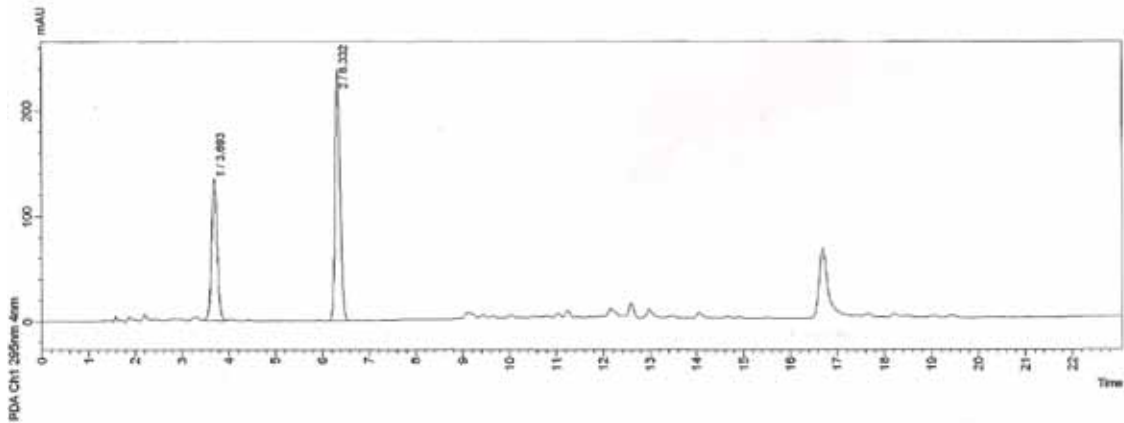


Fig. 8: Cromatograma de la fracción de cascarósidos obtenidos por TLC.

Como marcador de Cáscara Sagrada, se eligió el pico 2 de tiempo de retención 6.332 minutos debido a que no hay superposiciones con otros picos del extracto de aloe.

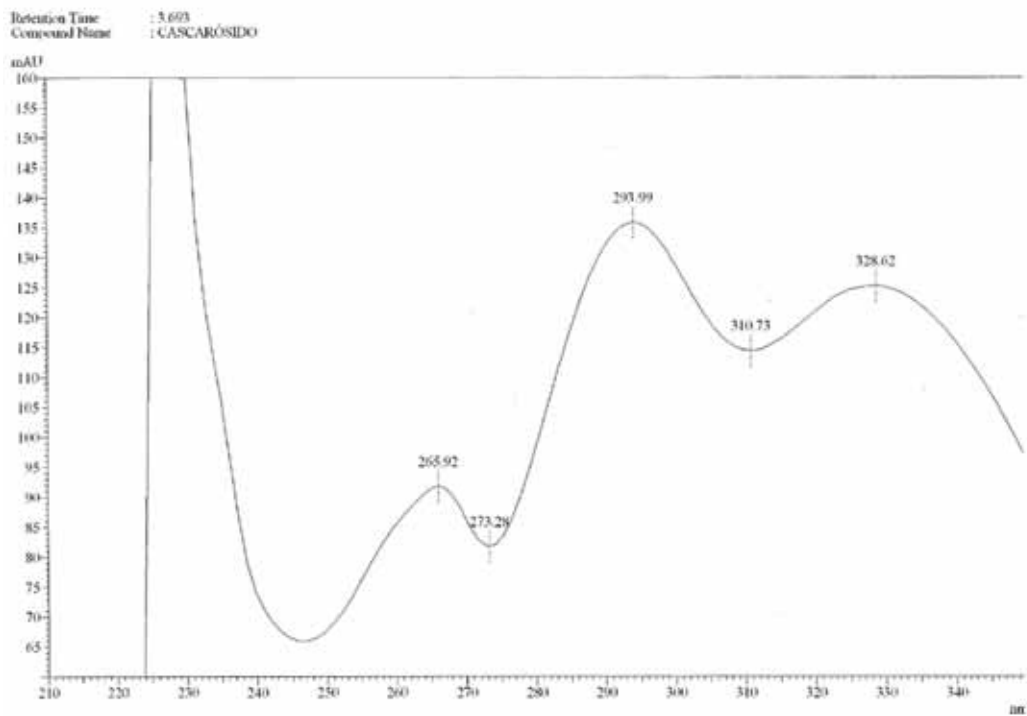


Fig. 9: Espectro Cascarósido (Tr = 3.693min).

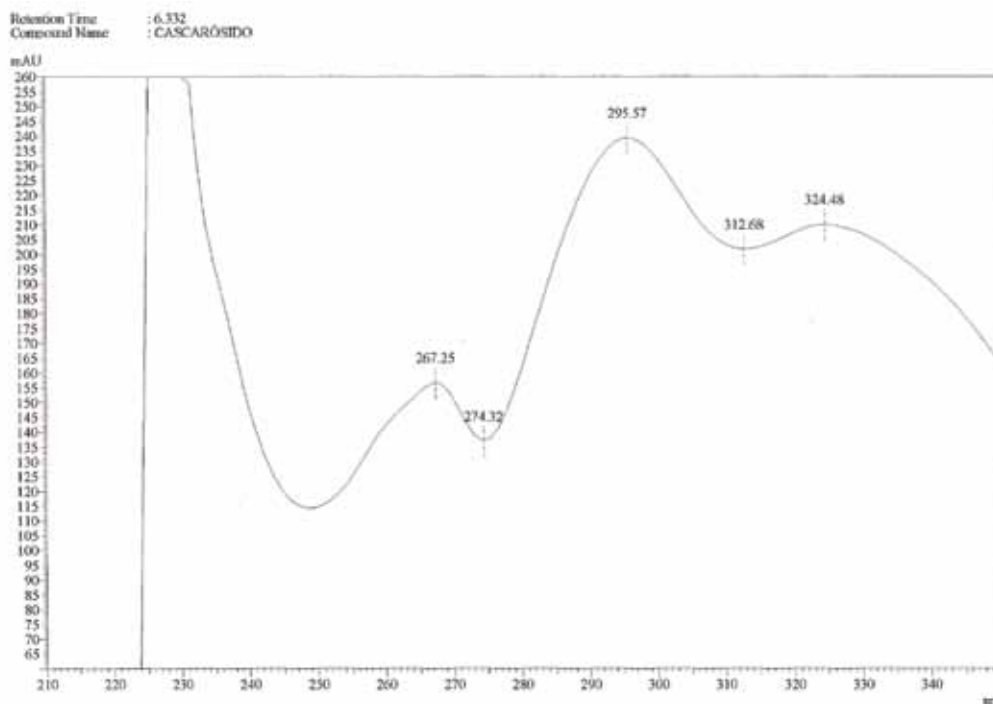


Fig. 10: Espectro Cascarósido (Tr = 6.332min).

Como marcador de Aloe, se utilizaron ambas aloínas (T_r aloína A = 12.971 y T_r aloína B = 13.381) debido a que no hay superposiciones con otros picos del extracto de Cáscara

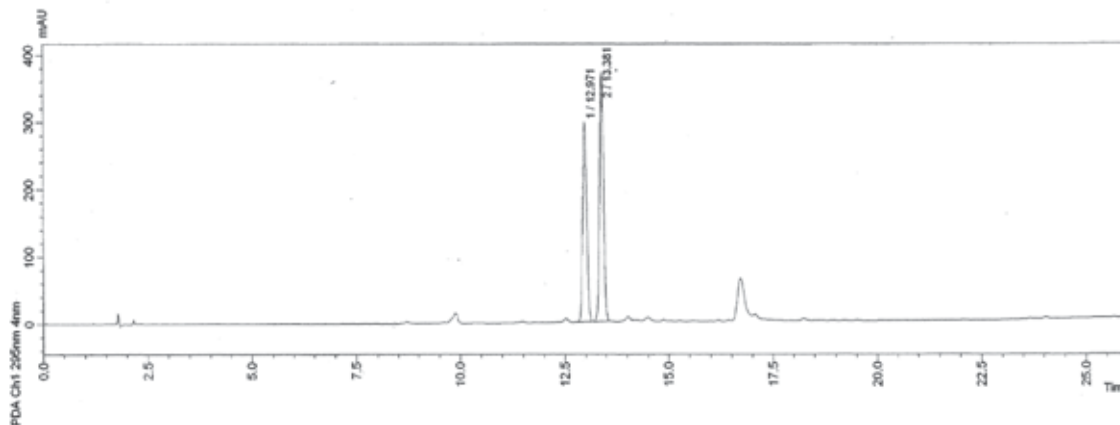


Fig. 11: Cromatograma Aloínas A/B.

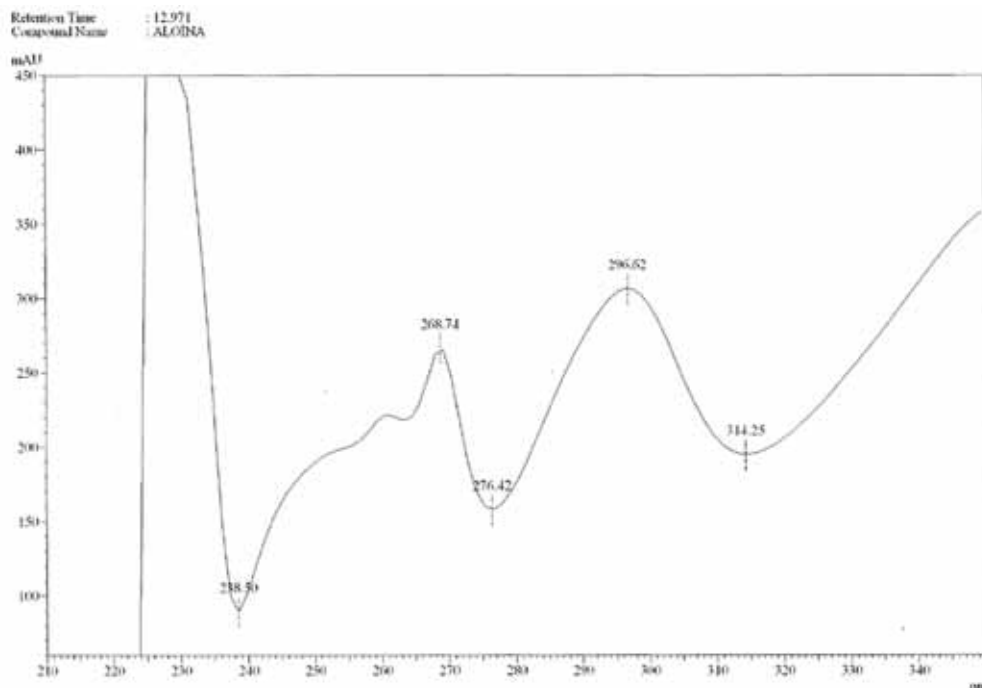


Fig. 12: Espectro de aloina A/B.

6 - Validación del método analítico

Se validaron los siguientes parámetros del método:

Exactitud: linealidad, recuperación de analito, linealidad de recuperación.

Especificidad.

6.1 - Linealidad

Se prepararon diez muestras: Cinco extractos de Aloe con valores de 60%, 80%, 100%, 120% de la concentración declarada en las cápsulas y cinco extractos de Cáscara Sagrada con valores de 60%, 80%, 100%, 120% y 140% de la concentración declarada en las cápsulas.

Cada extracto se inyectó por duplicado en orden creciente de concentración y leído a 295nm para Aloe y a 324nm para Cáscara. Los resultados se graficaron, y se calculó el coeficiente R².

Se tomó como criterio de aceptación un valor de coeficiente R² mayor o igual a 0,99.

6.1.1 - Cáscara Sagrada: Preparación de los extractos

Se prepararon extractos Agua – Metanol (50%-50%) pesando las cantidades indicadas de Cáscara Sagrada.

CÁSCARA SAGRADA		
Nivel	Peso (mg)	Porcentaje de la concentración declarada (%)
1	29,73	60
2	39,89	80
3	50,39	100
4	60,06	120
5	69,75	140

Tabla 2: Puntos de linealidad Cáscara Sagrada.

Todas las muestras se disolvieron en 50 ml de metanol:agua (50:50).

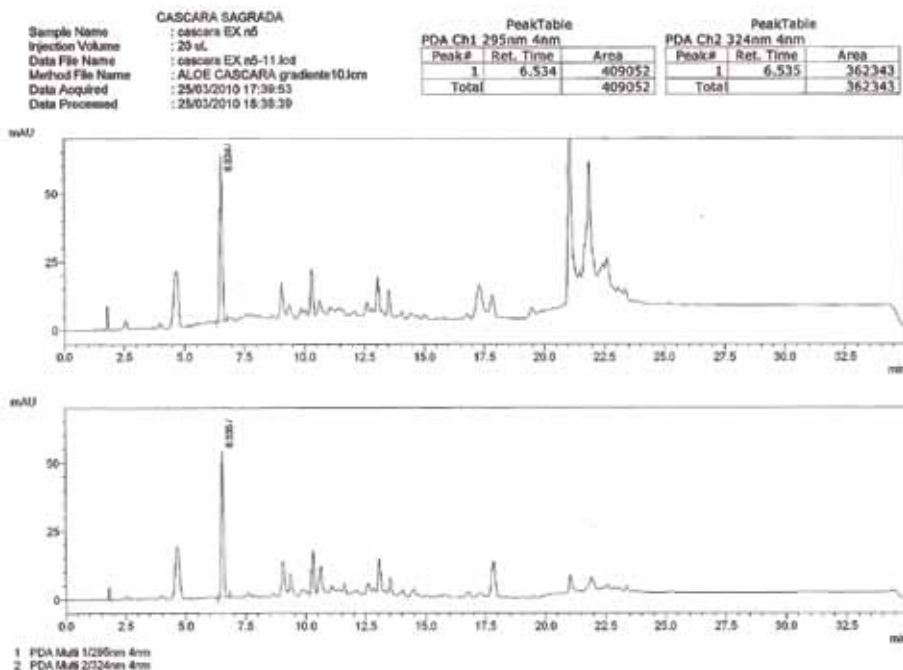


Fig. 13: Cromatograma Cáscara Sagrada a 295 y 394nm.

Se cuantificó a 324nm ya que no presentaba interferencia con aloe a esa longitud de onda.

A) Muestra @ 295nm (para valorar aloínas).

B) Muestra @ 394nm (para valorar el cascarósido).

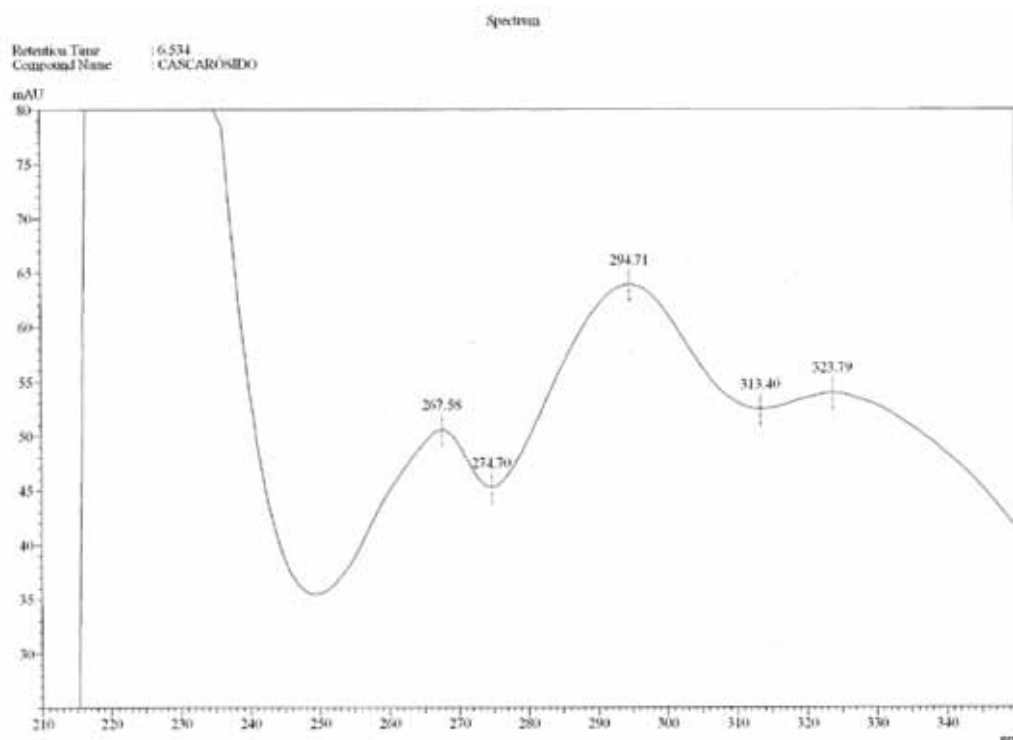


Fig. 14: Espectro del pico correspondiente al cascarósido de Tr = 6.534min en el cromatograma del extracto de Cáscara Sagrada.

Nivel		T _R	Área	Promedio	SD	Peso (mg)
1	Iny. 1	6,490	156927	156953	0,02	29,73
	Iny. 2	6,478	156979			
2	Iny. 1	6,501	203524	203983,5	0,32	39,89
	Iny. 2	6,535	204443			
3	Iny. 1	6,534	263304	263436,5	0,07	50,39
	Iny. 2	6,488	263569			
4	Iny. 1	6,505	315612	313821	0,81	60,06
	Iny. 2	6,496	312030			
5	Iny. 1	6,502	362408	362375,5	0,01	69,75
	Iny. 2	6,535	362343			

Tabla 3: Linealidad del método para Cáscara Sagrada.

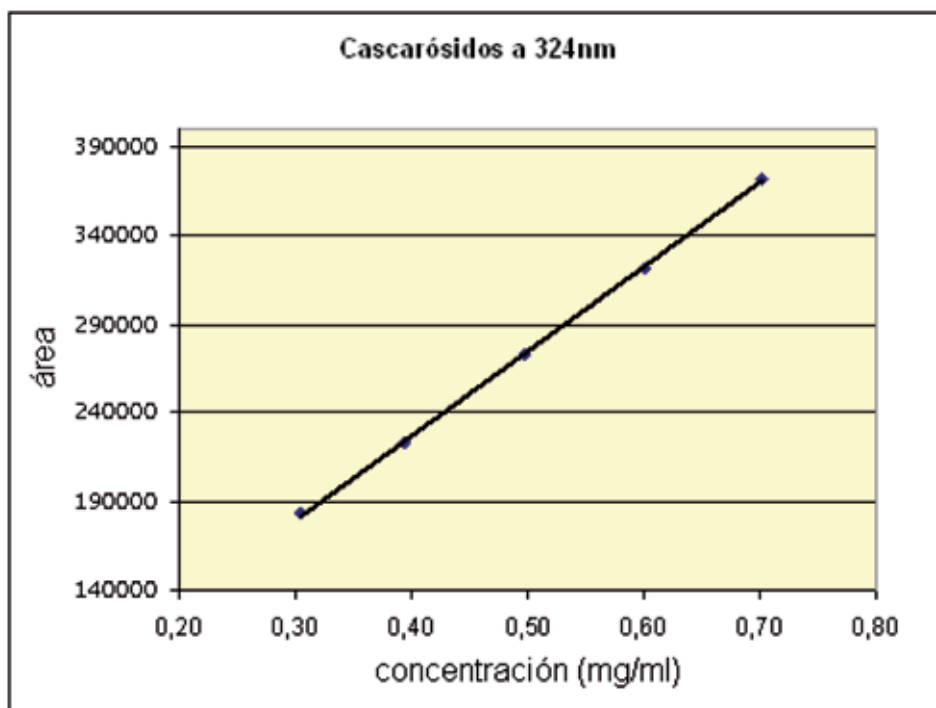


Fig. 15: Linealidad del método para Cáscara Sagrada.
R² = 0,9992.

6.1.2 - Aloe: Extractos

Se prepararon soluciones Agua – Metanol (50%-50%)

ALOE		
Punto	Peso (mg)	Porcentaje de la concentración declarada (%)
1	29,97	60
2	40,42	80
3	50,49	100
4	60,05	120
5	70,63	140

Tabla 4: Linealidad del método para Aloe.

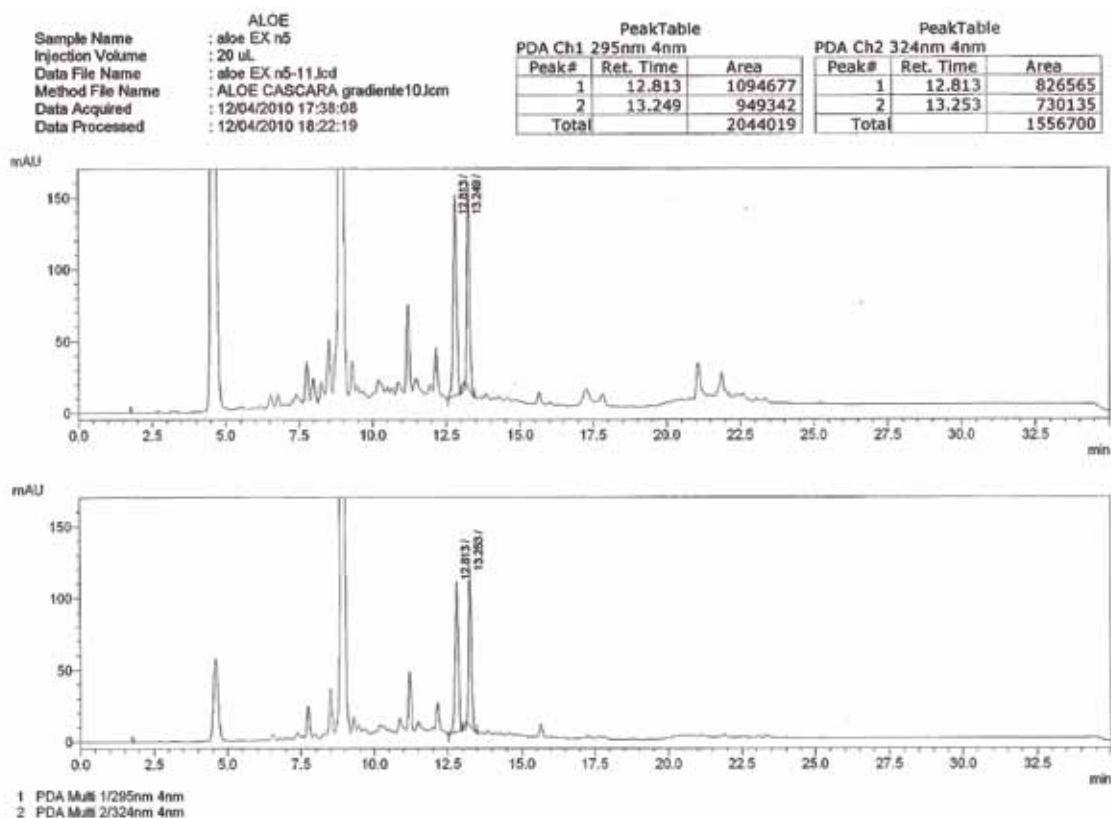


Fig. 16: Cromatograma extracto 5 de aloe a 295 y 394nm.
 Se cuantificó a 295nm ya que las aloínas tienen su máximo a esa longitud de onda.
 A) Muestra @ 295nm (para valorar aloínas).
 B) Muestra @ 394nm (para valorar el cascarósido).

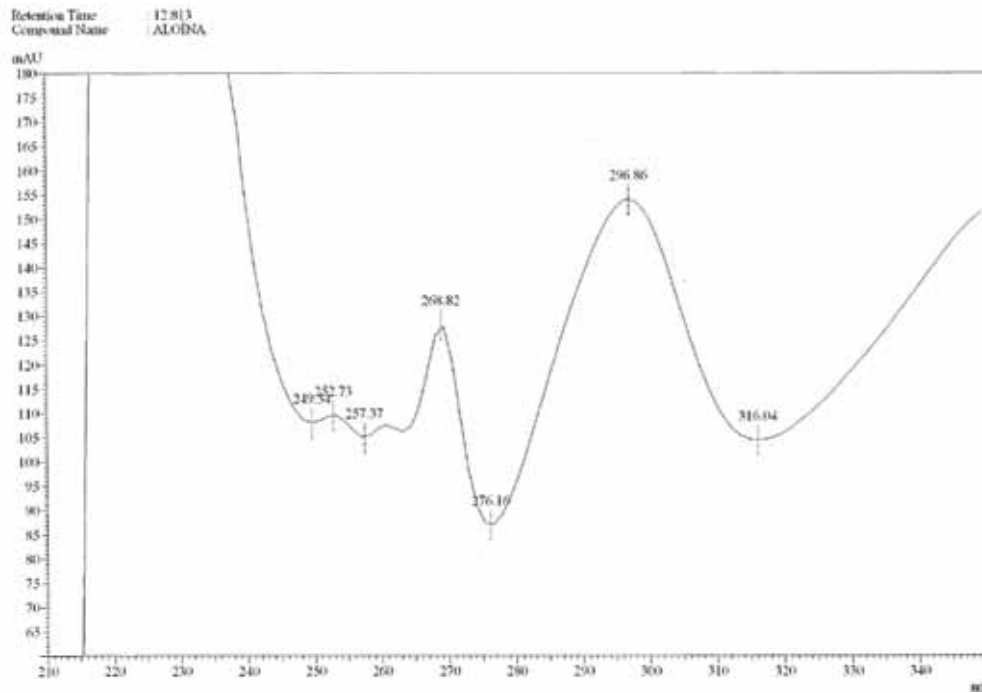


Fig. 17: Espectro del pico correspondiente a aloína de $T_R = 12.813$ en la muestra en el extracto de aloe.

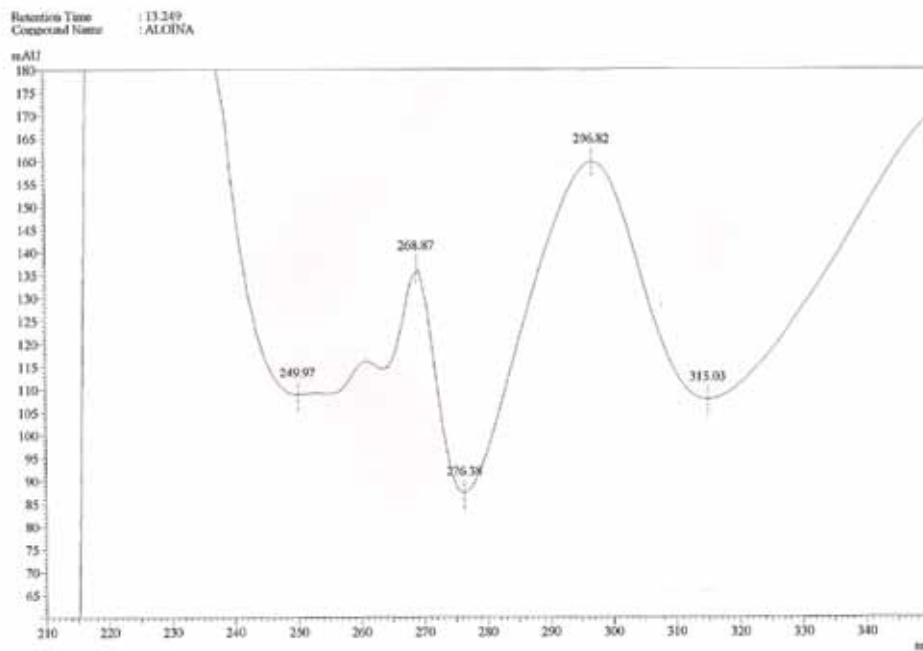


Fig. 18: Espectro el pico correspondiente a aloína testigo de $T_R = 13.249$.

Nivel		Área	Área	Suma de áreas	Promedio	SD	Peso (mg)
		Aloína B	Aloína A	Aloína A + B			
1	Iny. 1	470159	413918	884077	882405	0,27	29,97
	Iny. 2	470378	410355	880733			
2	Iny. 1	635157	554252	1189409	1187551	0,22	40,42
	Iny. 2	632465	553228	1185693			
3	Iny. 1	791150	687357	1478507	1474416,5	0,39	50,49
	Iny. 2	784323	686003	1470326			
4	Iny. 1	941373	810780	1752153	1749701,5	0,20	60,05
	Iny. 2	933248	814002	1747250			
5	Iny. 1	1098295	954048	2052343	2048181	0,29	70,63
	Iny. 2	1094677	949342	2044019			

Tabla 5: Linealidad del método para Aloe.

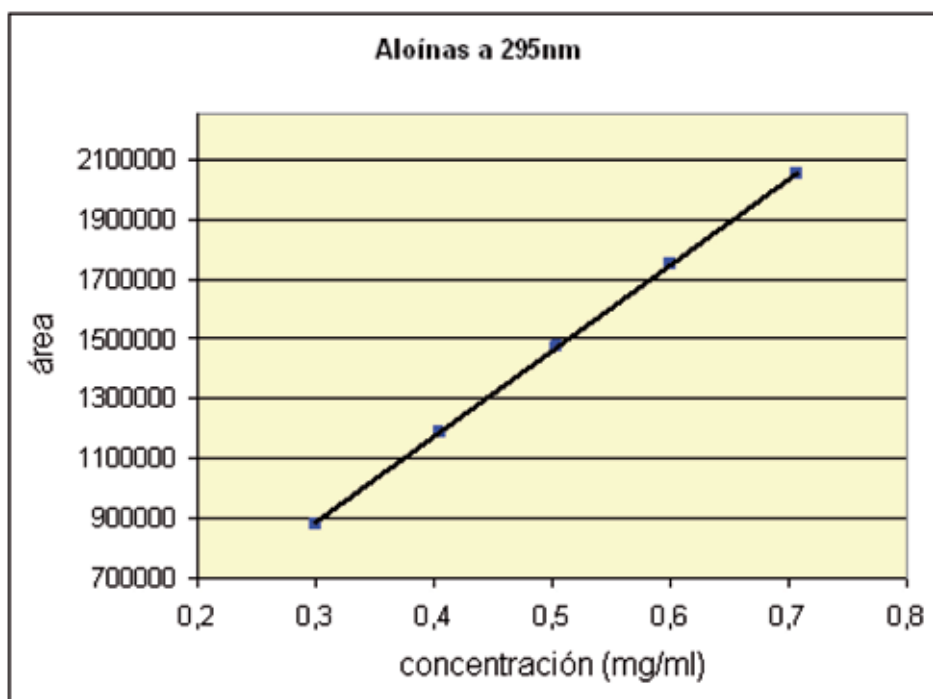


Fig. 19: Linealidad de Aloe $R^2 = 0,998$.

La linealidad evaluada en este rango de concentraciones presenta valores de coeficiente R^2 iguales o mayores a 0,99 para aloínas y cascarósidos leídos 295nm y a 324nm.

6.2 - Exactitud

Para exactitud se evaluó recuperación, linealidad de recuperación.

6.2.1 - Recuperación

Se analizó la recuperación del método para cada droga. Se prepararon tres muestras concentración teórica Aloe 60% - Cáscara Sagrada 140%, Aloe 100% - Cáscara Sagrada 100 y Aloe 140% - Cáscara Sagrada 60%.

6.2.2 - Linealidad de recuperación

Nivel		Área	Promedio	Peso (mg)	Recuperación %
Referencia	Iny. 1	266629	266737	51,02	-
	Iny. 2	266845			
1	Iny. 1	370892	369947,5	69,76	101,44
	Iny. 2	369003			
2	Iny. 1	278917	278318	50,66	105,08
	Iny. 2	277719			
3	Iny. 1	180180	180190,5	29,93	115,15
	Iny. 2	180201			

Tabla 6: Linealidad de recuperación de Cáscara Sagrada.

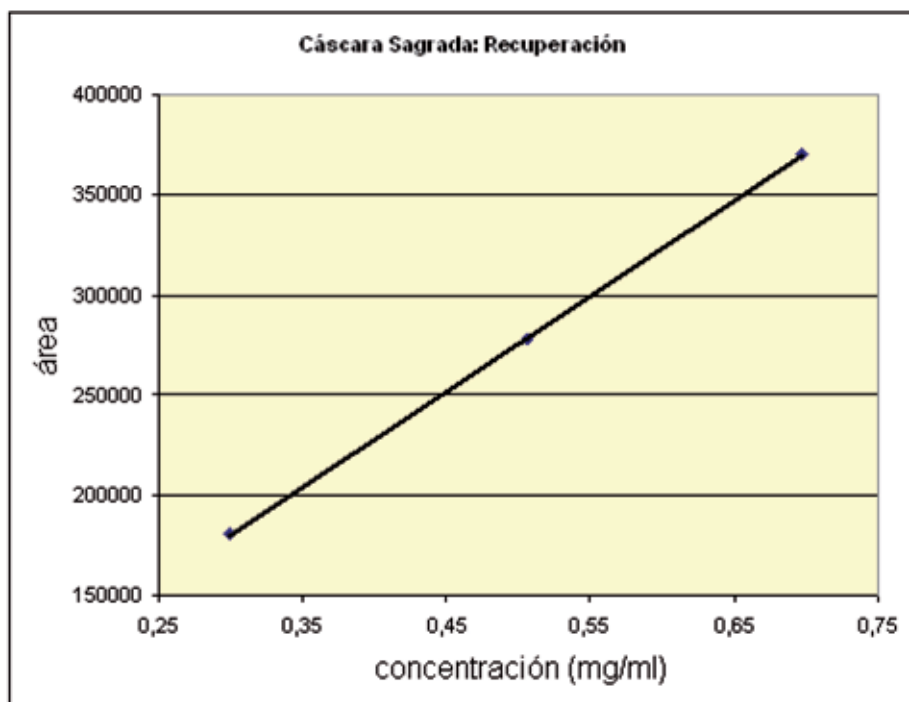


Fig. 20: Linealidad de recuperación de Cáscara Sagrada.

Aloe		Área Aloína A	Área Aloína B	Área Aloína A+B	Promedio	Peso (mg)	Recuperación %
Referencia	Iny. 1	797846	693981	1491827	1487325,5	50,90	-
	Iny. 2	789701	693123	1482824			
Punto 1	Iny. 1	453967	405234	859201	855438	31,02	94,38
	Iny. 2	453009	398666	851675			
Punto 2	Iny. 1	807711	674136	1481847	1481745,5	52,00	97,52
	Iny. 2	808789	672855	1481644			
Punto 3	Iny. 1	1077899	958948	2036847	2035977	69,99	99,55
	Iny. 2	1078071	957036	2035107			

Tabla 7: Linealidad de recuperación de Aloe.

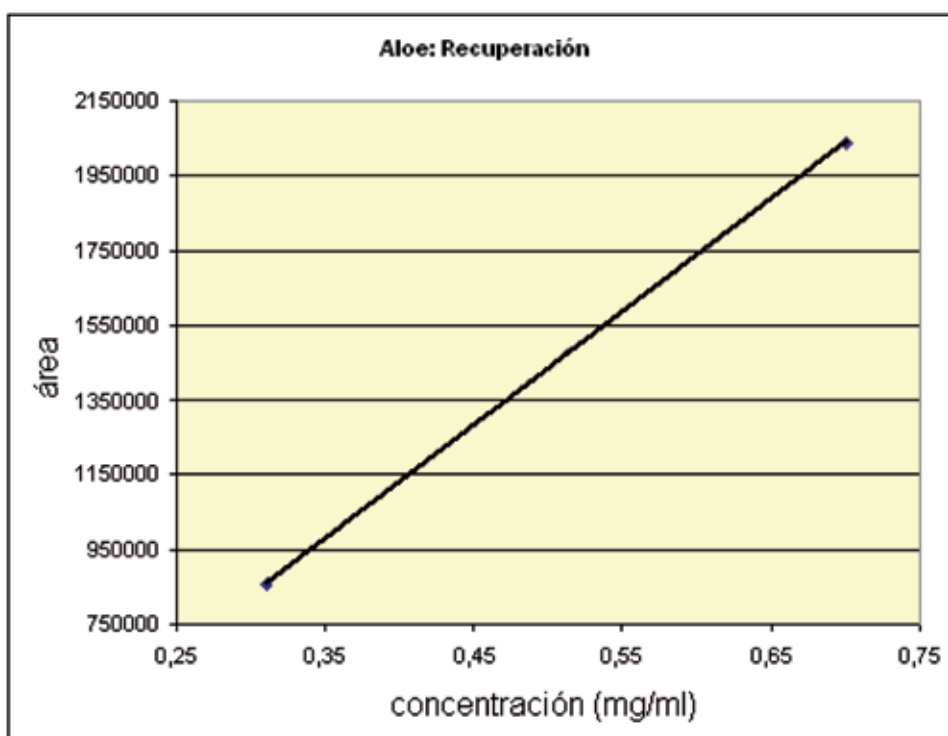


Fig. 21: Linealidad de recuperación de Aloe.

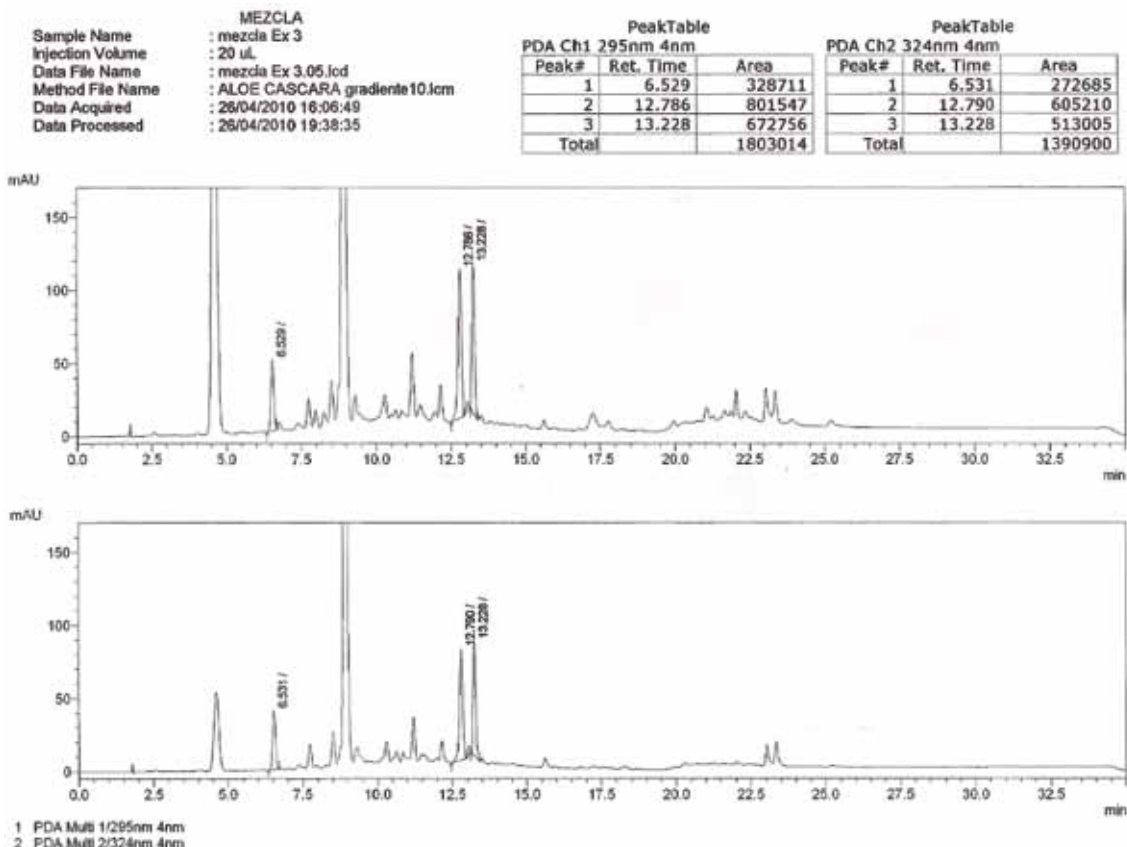


Fig. 22: Cromatograma solución Cáscara Sagrada y Aloe (extracto 3).

Aloe se valora a 294nm y Cáscara Sagrada a 394nm.

A) Muestra @ 295nm (para valorar aloínas).

B) Muestra @ 394nm (para valorar el cascarósido).

La recuperación para Aloe es 97.20% y para Cáscara Sagrada es de 105.08% para el punto 2 (100% del valor declarado de Aloe).

6.3 - Especificidad

En los cromatogramas del extracto de Aloe, no hay ningún pico significativo que se superponga con los picos correspondientes a las aloínas y el espectro UV/Vis de los picos correspondientes a aloína A/B en el producto terminado coincide con los de la sustancia de referencia. Por otro lado, se comprobó que ninguna sustancia correspondiente a Aloe se superpone con el pico correspondiente al cascarósido utilizado como marcador de Cáscara.

El espectro UV/Vis del pico correspondiente al cascarósido en el cromatograma de producto terminado coincide con el del cascarósido en la solución de referencia.

7 – Cuantificación de Cáscara Sagrada y Aloe en cápsulas

7.1 - Preparación de soluciones:

7.1.1 - Fase móvil

Solución A: Medir exactamente 1 ml de ácido acético glacial, colocar en matraz de 100ml y llevar a volumen con agua purificada calidad HPLC.

Solución B: Medir exactamente 1 ml de ácido acético glacial, colocar en matraz de 100ml y llevar a volumen con metanol calidad HPLC.

7.1.2 - Solvente de dilución

Mezclar 3 partes de metanol calidad hplc y 1 parte de agua purificada calidad HPLC.

7.1.3 - Solución testigo

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de aloe, zumo desecado y 75 mg de cáscara sagrada (polvo), colocar en un matraz de 50 ml, agregar 20 ml de solvente de dilución y sonicar durante 10 minutos. Llevar a volumen con solvente de dilución y filtrar por membrana de nylon 0.45µ de diámetro de poro.

7.1.4 - Solución muestra

Pesar 10 cápsulas por separado, registrando el peso individual. Vaciar las cápsulas completamente y registrar el peso de las mismas. Calcular el contenido promedio de las cápsulas. Pesar una cantidad de polvo equivalente a 50% del contenido de una cápsula (≈ 180 mg) y transferir a un matraz de 50 ml. Agregar 20 ml de solvente de dilución y sonicar durante 15 minutos. Llevar a volumen con solvente de dilución y filtrar por membrana de nylon de 0.45 µ de diámetro de poro.

7.2 - Procedimiento

Inyectar la solución testigo por duplicado, registrando el cromatograma a 295 y 324nm. Identificar el área correspondiente al cascarósido (324 nm) y los dos picos correspondientes a aloína A y B (295 nm). Inyectar la solución muestra por duplicado, registrando el cromatograma a 295 y 324 nm. Identificar los picos correspondientes a cascarósido (324 nm) y aloínas A y B (295 nm).

7.3 - Cálculos

Calcular la cantidad de activo en cada cápsula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Aloe (mg)} = \frac{\text{Área}_{\text{MT}} \times \text{Conc}_{\text{T}} \times \text{Peso}_{\text{PROM}}}{\text{Área}_{\text{T}} \times \text{Peso}_{\text{MT}}}$$

Dónde:

Área_{MT} = Sumatoria de las áreas de Aloínas A y B detectadas en la inyección de la solución muestra.

Área_T = Sumatoria de las áreas de Aloínas A y B detectadas en la inyección de la solución testigo.

Conc_T = Concentración de Aloe (materia prima utilizada para la fabricación del lote analizado) expresado en mg/ml.

Peso_{MT} = Peso de la muestra (expresado en mg).

Peso_{PROM} = Peso promedio del contenido de las cápsulas (expresado en mg).

$$\text{Cáscara Sagrada (mg)} = \frac{\text{Área}_{\text{MT}} \times \text{Conc}_{\text{T}} \times \text{Peso}_{\text{PROM}}}{\text{Área}_{\text{T}} \times \text{Peso}_{\text{MT}}}$$

Dónde:

Área_{MT} = Área del pico de Cascarósido en la inyección de la solución muestra.

Área_T = Área del pico de Cascarósido en la inyección de la solución testigo.

Conc_T = Concentración de Cáscara sagrada (materia prima utilizada para la fabricación del lote analizado) expresado en mg/ml.

Peso_{MT} = Peso de la muestra (expresado en mg).

Peso_{PROM} = Peso promedio del contenido de las cápsulas (expresado en mg).

8 – Conclusión

Al cuantificar una droga en particular presente en una forma farmacéutica compuesta por varias drogas vegetales, el empleo de un método cromatográfico instrumental en general supera ampliamente a las técnicas espectrofotométricas tales como las propuestas por la BP 2007 para materias primas ya que las mismas carecen de la especificidad necesaria.

No existen métodos codificados para combinaciones de de Cáscara y Aloe por lo que fue necesario desarrollar un método de valoración por HPLC para producto terminado que permitiera valorar cada droga por separado y si fuera posible, en una misma corrida por cuestión de tiempo y recursos.

Cuando la fórmula cuali-cuantitativa de un fitoterápico está expresada en cantidad de droga vegetal, una vez identificados los marcadores de las mismas es conveniente utilizar la materia prima utilizada para la fabricación del lote del producto terminado como sustancia de referencia.

Tanto las aloínas como el cascarósido utilizado como marcador de Cáscara se pueden detectar en el producto terminado de manera lineal en un amplio rango de concentraciones (40-140% del contenido de Aloe y Cáscara declaradas), tanto en extracto obtenido con la materia prima individual como en extracto obtenido con las proporciones analizadas para el ensayo de recuperación.

La validación del método permitió concluir que el mismo es lineal, ya que el coeficiente de regresión lineal calculado resultó ser igual o mayor a 0,99 en el rango (75-150%) analizado.

En cuanto a la especificidad, se confirmó que no hay superposiciones significativas con otros picos tanto para los marcadores de Aloe, como para el marcador de Cáscara.

Se desarrolló por lo tanto un método sencillo, exacto y lineal que permite valorar por HPLC el producto terminado.

9 – Referencias bibliográficas y material de consulta

British Pharmacopoeia 2007 (Barbados Aloes, pág. 3374).

British Pharmacopoeia 2007 (Cape Aloes, pág. 3374).

British Pharmacopoeia 2007 (Cascara Sagrada pág. 3435).

Bruneton, Jean (2001). 'Farmacognosia: fitoquímica y plantas medicinales' 2ª edición Editorial Acribia.

Farmacopea Nacional Argentina 8va. Edición (2003). Cáscara Sagrada.

Flórez, Jesús. Armijo, Juan & Mediavilla, África (2008). 'Farmacología Humana',

5ª edición. Editorial Elsevier Masson.

United States Pharmacopoeia 30 (2007). Cascara Bark.

Wagner, Hildebert & Bladt, Sabine. 'Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas', 2ª edición (1996).

World Health Organization (1999). Monographs on Selected Medicinal Plants – Vol. 1.

World Health Organization (2004). Monographs on Selected Medicinal Plants – Vol. 2.

