

Tema 12. ANÁLISIS QUÍMICO DE PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES.

- 12.1 Introducción
- 12.2 Obtención y preparación de la muestra
- 12.3 Ensayos morfológicos, anatómicos y organolépticos
- 12.4 Ensayos físico-químicos cualitativos y cuantitativos
- 12.5 Bibliografía y Enlaces

12.1 INTRODUCCIÓN

El Análisis Químico se PAM consiste en la determinación de la estructura y composición química de alguna parte de la planta. Actualmente se considera como una referencia indispensable para determinar la calidad para el empleo de las mismas, especialmente cuando van a ser empleadas en medicamentos fitoterápicos o especialidades farmacéuticas.

Así mismo, es una herramienta muy útil para determinar absorción de sustancias tóxicas por las plantas, residuos de plaguicidas, y las posibles consecuencias derivadas de procesos de contaminación atmosférica, de las aguas o de los suelos. En taxonomía vegetal, permite la identificación química de especies y quimiotipos.

El proceso de obtención y análisis de los extractos de plantas medicinales consta de las etapas siguientes:

- Obtención de la muestra a partir de la materia prima. La muestra a analizar puede ser planta entera, troceada, pulverizada, aceites esenciales o extractos.
- Determinación del contenido en humedad, cenizas, residuo seco, etc., de la materia vegetal.
- Obtención y análisis de la fracción volátil (aceites esenciales).
- Obtención y análisis de la fracción no volátil (nutrientes, elementos minerales, extractos).
- Análisis físico – químico cualitativo y cuantitativo
- Expresión de los resultados

El objetivo final será determinar:

- Identificación de la muestra
- Contenido en humedad.
- Contenido en elementos minerales o cenizas.
- Identificar y cuantificar los principios activos.
- Valorar el rendimiento en aceites y extractos.
- Determinar las características físicas (peso específico, índice de refracción, poder rotatorio y solubilidad en etanol) y químicas (índices de ácido, de éster y de saponificación) de los componentes analizados.

En este tema, se hace referencia a los métodos descritos por la **Farmacopea**. La Ley 25/90 del Medicamento define a la Real Farmacopea Española (RFE) como *el código que deberá respetarse para asegurar la uniformidad de la naturaleza, calidad, composición y riqueza de las sustancias medicinales y excipientes*.

La Farmacopea incluye monografías sobre las distintas especies medicinales y las exigencias mínimas de obligado cumplimiento sobre:

- Carácter de la sustancia medicinal
- Excipientes
- Métodos de ensayo y análisis
- Procedimientos de preparación, esterilización, conservación y acondicionamiento

La RFE está constituida por:

- Monografías peculiares españolas
- Monografías contenidas en la Farmacopea Europea (FE)

La RFE está dirigida, fundamentalmente, a la industria farmacéutica.

12.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Las muestras de materia vegetal se recolectan en la época elegida, antes, durante o tras la floración. Se obtiene una muestra completa, de hojas, flores y tallos, y raíces en caso de que interese estudiar algún principio activo contenido en ellas.

Se dejan secar al aire hasta peso constante, y se separan hojas, tallos y flores, pesando cada una de las submuestras. Si es necesario, las plantas se trituran con un molinillo, aunque la molienda se puede llevar simplemente a mano, en pequeños trozos.

Cuando lo que se va a analizar es materia vegetal con destino farmacológico, el control de calidad es muy importante en el muestreo, y hay que seguir las normas establecidas por la Farmacopea, o las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998), y tener en cuenta una serie de parámetros, como por ejemplo el grado de división que presenta el material vegetal, el espesor del lote, el número de contenedores etc., y las determinaciones se deben hacer a partir de una muestra que sea representativa del lote completo.

Los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de los principios activos contenidos en una planta, y por tanto, se obtienen mediante técnicas de destilación, en la que se volatilizan estos principios por calor, se condensan en frío y se recogen (aunque hemos visto que en ocasiones se emplean otras técnicas como la expresión o el *enfleurage*).

Los extractos consisten en la fracción no volátil de los principios activos, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción que veremos a continuación.

En general, la fracción volátil o aceite esencial se analiza posteriormente mediante CGL (ó CGL-MS), ya que esta técnica es válida para compuestos volatilizables, y los extractos ó fracción no volátil, por HPLC, ya que esta técnica es válida para sustancias no volatilizables o termolábiles.

A. Métodos de obtención de aceites esenciales. Destilación

Los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de estudio en plantas aromáticas y medicinales, compuesta por terpenos y derivados, derivados del benceno y otros. Se

determinan por cromatografía de gases (CGL) y espectrometría de masas si es necesario, tras extracción por destilación de arrastre de vapor a presión atmosférica.

La **destilación** consiste en la separación de los componentes de una muestra en función de la diferencia de presión de vapor y punto de ebullición.

Se conoce como punto de ebullición la temperatura a la cual, a una presión determinada, un líquido pasa a vapor, o la temperatura a la cual la presión del líquido equivale a la del gas alrededor.

Cuando se destila a presión atmosférica, corresponde a una columna de 760 mm Hg. Una reducción de presión disminuye también el punto de ebullición, mientras que un aumento de presión lo eleva.

Una mezcla de componentes no tiene un punto de ebullición, sino un rango. Los distintos aceites esenciales tienen gran variedad de composición y puntos de ebullición, y la destilación se lleva a cabo en función de ello. Los distintos aceites poseen distintos puntos de ebullición, por lo cual la destilación de los mismos ocurre en un rango de temperaturas que suele oscilar entre los 150 y los 300° C.

Cuando la destilación separa los componentes dando lugar a dos fases no miscibles se llama hidrodestilación, y se llevará a cabo en destilador de cristal cuando el peso de la muestra sea inferior a 1 Kg (a escala de laboratorio) y en caldera de acero inoxidable cuando sea superior.

En primer lugar, la planta ha de ser preparada para que los aceites abandonen las glándulas en los que están contenidos, para lo cual se lleva a cabo la molienda, que dependerá del tipo de muestra (hojas, flores, y partes no fibrosas o frutos y semillas).

La muestra se coloca en la rejilla de la caldera y se hace pasar vapor a través de ella, que arrastrará los aceites, los cuales condensan en el condensador. Los efectos de la hidrodestilación son la difusión de aceites a partir de las membranas o hidrodifusión, la hidrólisis de ciertos componentes y la descomposición por calor de los mismos. Los tres fenómenos ocurren simultáneamente, y afectarán el uno al otro.

Hidrodifusión: sólo una pequeña parte de los aceites está presente en la superficie de las plantas, disponible para la vaporización. El resto de los aceites llega a la superficie por difusión a través de los tejidos de la planta, ya sea libre o por ósmosis a través de membranas permeables a uno o todos los componentes. El vapor en la destilación no suele penetrar las membranas, por lo que el proceso se basa en la ósmosis. Ofrece buenas condiciones para ello porque la temperatura y el movimiento del agua aceleran las fuerzas de difusión.

Calor: la temperatura es mínima al inicio de la destilación y se vaporizan los componentes con menor punto de ebullición, y va aumentando hasta llegar a la temperatura de saturación de vapor a la presión dada. Para mayor calidad de los aceites, la temperatura se debe mantener lo más baja posible, o el menor tiempo posible a alta temperatura.

Hidrólisis: es una reacción química entre el agua y los componentes de la planta, de los aceites, en general ésteres, que tiende a formar los ácidos y alcoholes correspondientes. Son importantes la cantidad de agua empleada y el tiempo de contacto entre el aceite y el agua.

Los principios de la hidrodestilación son mantener la temperatura lo más baja posible, sin olvidar que el grado de producción también depende de ella; emplear la menor cantidad de agua o vapor en contacto con la planta, pero favoreciendo la difusión; llevar a cabo una molienda y empaquetado de la muestra cuidadosos pero no excesivos.

La ventaja de este método de extracción es la baja inversión inicial necesaria para adquirir los equipos y accesorios. Se trata de un proceso simple, versátil y flexible, que permite trabajar con grandes volúmenes de materia prima en cada ciclo, incluso sin tratamiento previo. No se altera el tiempo de extracción, pero lo hace el rendimiento.

Los inconvenientes con los que nos encontramos son que se produce degradación térmica en el aceite esencial obtenido, es decir, se inducen cambios químicos e indeseables, como oxidación, hidrólisis y oligomerización y que tiene altos costes operativos por carga de materia prima, a causa de la necesidad de energía para producir el vapor de agua.

B. Métodos de obtención de extractos vegetales. Extracción

Entre los procesos extractivos de los diferentes fitoquímicos, aceites esenciales, etc. destacan las nuevas tecnologías de extracción entre las que se encuentra la extracción en fluidos supercríticos. Pero todavía a menudo se utilizan otros procesos extractivos más convencionales, como los de arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación.

a. EFS, fluidos supercríticos

Extraer la cafeína del café, obtener alimentos sin colesterol o purificar antioxidantes naturales a partir de plantas aromáticas son procesos de extracción que se pueden realizar con fluidos supercríticos.

Un **fluido supercrítico** es una sustancia, mezcla o elemento que, mediante operaciones mecánicas, bajo unas condiciones operativas de presión y temperatura, se sitúa por encima de su punto crítico, pero por debajo de la presión que hace falta para condensarlo en un sólido.

La extracción mediante fluidos supercríticos es más respetuosa con el medio ambiente que los métodos de extracción convencionales, ya que utiliza gases como el CO₂ a elevada presión, en estado líquido o supercrítico, en lugar de disolventes clorados, que producen residuos tóxicos.

El CO₂ es lo que se denomina un disolvente ecológico (comúnmente denominado en inglés **green solvent**). No es tóxico, no contamina, no es inflamable, es económico, fácil de reciclar, y, por lo tanto, no plantea un problema medioambiental de gestión de residuos.

Como características de un fluido supercrítico podemos destacar:

- Tienen un gran **poder disolvente** y una enorme **capacidad de penetración en sólidos**, lo que permite el agotamiento rápido y prácticamente total de los sólidos extraíbles.
- Se pueden separar totalmente y de forma sencilla de los extractos, sólo modificando la presión o la temperatura, hasta el extremo, si es necesario, en que el fluido pasa al estado gaseoso.

El principal **inconveniente** de los fluidos supercríticos es el **tiempo de extracción**, que es generalmente largo. De hecho, en algunos casos puede llegar a tardar **24 horas**. Con el fin de

acelerar los procesos de extracción con fluidos normales, se utiliza la agitación mecánica, pero ésta presenta muchas dificultades cuando se trata de fluidos supercríticos, por lo que sus aplicaciones industriales son limitadas.

En España, un equipo de investigadores del (CSIC), la Universitat Politècnica de València (UPV) y el centro tecnológico AINIA, ha investigado y experimentado la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad para poder acelerar el proceso de extracción con fluidos supercríticos. El proceso ya se ha para la extracción de aceite de almendras naturales, enteras y troceadas en distintos tamaños de partícula.

b. Extracción por solución

Precisa una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor, pero genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse «prácticamente todos» los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc.

Por otra parte, precisa de equipos de vacío para poder obtener los aceites absolutos, con altos costes operativos en comparación con los de extracción por arrastre o EFS. Y sobre todo es necesario utilizar disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc.

También conlleva necesariamente establecer etapas adicionales de purificación si la esencia o el producto se van a destinar al consumo o la higiene humana. Esta restricción ha implicado tener que buscar nuevas soluciones y optimizar al máximo su recuperación, pero también ha elevado su coste y su aplicación.

Para ello se lleva a cabo una extracción con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura.

Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, no soluble en agua, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato.

Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70 °C, se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua.

La extracción puede ser sólido – líquido o líquido – líquido en función del estado de la muestra.

• Extracción sólido – líquido

Cuando se trata de una muestra sólida, se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente en el que sean muy solubles, que los diferencie de las sustancias presentes en la matriz, que han de ser muy insolubles en ese disolvente.

Se suele hacer con agitación, temperatura o ultrasonidos para una mayor eficacia. Normalmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los sólidos que hayan podido quedar.

- **Extracción líquido - líquido.**

Consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmisible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible.

El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento.

- c. **Extracción por centrifugación**

Los extractos y aceites obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a las conseguidas por extracción por arrastre de vapor.

Al no ser un proceso térmico, sus propiedades son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Aun así, la fricción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y un oscurecimiento del extracto.

Este cambio requiere el empleo de equipos de purificación adicionales con altos costes operativos que incrementan el precio final del producto.

- d. **Extracción en fase sólida**

Se emplean columnas o cartuchos capaces de retener el analito, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente.

12.3 3. ENSAYOS MORFOLÓGICOS, ANATÓMICOS Y ORGANOLÉPTICOS.

Estos ensayos sirven para confirmar la identidad de la planta o droga, da una idea de su conservación, y detectas posibles adulteraciones o falsificaciones.

A. Análisis organoléptico

Los caracteres **organolépticos** incluyen olor, color, sabor y textura.

Olor. Aromático, aliáceo, alcanforado, nauseabundo, desagradable, a especia, etc. Muchas plantas y drogas poseen olores característicos como la menta, anís, canela...

Color. Uniforme o no. Cuando la droga viene en **polvo**, el color por ejemplo puede dar una idea de la parte de la planta de que se trate, por ejemplo, el color verde indica que el polvo procede de hojas o partes aéreas, el marrón de cortezas, tallos y raíces, y el blanco de féculas y gomas.

Sabor. Dulce, amargo, astringente, ácido, salino, punzante, nauseabundo, aromático.

B. Análisis macroscópico

Las características **macroscópicas** se pueden observar a simple vista o con la lupa. Se observan caracteres como forma, dimensiones, pilosidad, nerviación, superficie, fractura, sección, grosor y dureza de la planta entera o partes de la planta.

- **Tallos.** Tipo, sección, disposición de las hojas.
- **Hojas.** Forma, nerviación, pelos, textura.
- **Inflorescencias.** Disposición de las flores, brácteas.
- **Flores.** Cáliz, corola, estambres, carpelos.
- **Frutos.** Tipo, forma y dimensiones.
- **Semillas.** Tamaño, color, forma.
- **Corteza.** Color, estriaciones, arrugas.
- **Leño.** Zonas de crecimiento, vasos, radios medulares.
- **Órganos subterráneos.** Forma, aspecto, consistencia.

La observación minuciosa de las características morfológicas propias de cada órgano permitirá una correcta identificación de la mayoría de las drogas.

C. Análisis microscópico

Las características **microscópicas** y cortes histológicos son importantes. Observan al microscopio elementos celulares como pelos, vasos, esclereidas, estomas, y acelulares, como cristales y granos de almidón. Con ellos se puede confirmar la identidad de las drogas cuando los análisis macroscópicos han sido insuficientes. También son necesarios para descartar la presencia de adulteraciones.

Cortes histológicos. No se puede aplicar siempre, solo en droga entera o fragmentos, pero no en droga pulverizada. En ellos se pueden observar contenidos celulares, estructuras.

Drogas pulverizadas. Las características organolépticas y macroscópicas son insuficientes para su identificación, por lo que se hace necesario el estudio microscópico. Se observan los contenidos celulares (granos de fécula y aleurona, cristales, grasas y esencias), los elementos celulares (vasos, traqueidas, células epidérmicas, estomas, parénquima, colénquima, súber, esclerénquima, células pétreas, fibras y pelos o tricomas).

12.4 ENSAYOS FÍSICO – QUÍMICOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS

Se denominan así a los ensayos que se realizan sobre la droga entera, pulverizada o extractos de la planta. Son ensayos cualitativos o cuantitativos que permiten conocer la composición de la droga o planta, caracterizar principios activos y reconocer falsificaciones.

Se realizan con una finalidad cualitativa (identificar sustancias), cuantitativa (determinar su concentración) o ambas.

Los ensayos cuantitativos son los siguientes

- Humedad
- Cenizas
- Residuo seco
- Materia extraíble
- Parámetros físicos (densidad, poder rotatorio, índice de refracción)
- Índices químicos (acidez, saponificación, sobre todo para aceites esenciales)
- Índices de hinchamiento (para mucílagos)
- Índices de espuma (para saponinas)
- Contaminantes. Metales pesados, plaguicidas, aflatoxinas.

Los ensayos cualitativos son los siguientes

- Reacciones de identificación. Coloreadas, de precipitación, fluorescencia, microsublimación, etc, que permiten detectar determinados constituyentes característicos de una planta (flavonoides, alcaloides, etc.).
- Métodos cromatográficos. Permiten separar los diferentes componentes de un extracto, esencia, etc.
- Métodos espectroscópicos. Permiten la identificación de sustancias.

A. ENSAYOS CUANTITATIVOS.

a. Humedad

Se entiende por humedad el agua libre que contiene el material vegetal. Para una buena conservación ha de ser inferior al 10%, para evitar los procesos enzimáticos, y para expresar la valoración de los principios activos referidos a materia seca. Existen varios métodos para la determinación de la humedad.

Método gravimétrico. Se pesa una cantidad exacta de droga seca, pulverizada o troceada y se pone en estufa a unos 110 °C, pesándola cada media hora hasta peso constante. La diferencia entre el peso inicial y final es el contenido en agua o humedad aparente. Pueden perderse sustancias volátiles, por lo que en ocasiones este método no puede utilizarse.

Método volumétrico (foto). Se determina el contenido en agua por arrastre azeotrópico. Una cantidad exacta de materia vegetal se coloca en un matraz con benceno, tolueno o xileno, y se lleva a destilación en circuito cerrado. El vapor de agua condensa y al ser inmiscible forma una fase separada y visible, de la cual se determina el volumen.

Método Karl-Fisher. Muy útil en muestras con bajo contenido en humedad, se basa en la reacción cuantitativa del agua con dióxido de azufre y yodo en medio anhidro y presencia de una base. El yodo y anhídrido sulfuroso en presencia de agua reaccionan, formando sulfúrico y ácido yodhídrico. Para desplazar el equilibrio se emplea una base como la piridina.

b. Determinación de cenizas

Representan el contenido en sales minerales o en materia inorgánica de la droga. En condiciones rigurosas, es constante y nos permite descubrir falsificaciones por otras drogas, tierras u otros minerales.

Las cenizas dan una idea del contenido en materia mineral de la planta, que suele ser alrededor del 5%.

Su determinación es importante porque la materia mineral puede ser responsable de alguna acción farmacológica (por ejemplo, las sales de potasio son responsables de la acción diurética del equiseto, diente de león y ortosifon).

También si su contenido es elevado, puede ser indicador de contaminación por adición de materia mineral o tierra, especialmente en raíces.

Cenizas totales. Se basa en calcinar hasta que quedan blancas. El residuo que queda corresponde a las cenizas derivadas del tejido vegetal (cenizas fisiológicas) y a las de la materia extraña (cenizas no fisiológicas).

Cenizas sulfúricas. Se añade H_2SO_4 antes de calcinar, obteniendo los sulfatos de los cationes. Son mucho más estables que las totales.

Cenizas insolubles en HCl. Es el residuo que queda tras extraer las totales o las sulfúricas con HCl. La sílice es insoluble en HCl, por lo que indican presencia de arena o tierra.

c. Nutrientes

Los nutrientes se analizan a partir de las cenizas totales de 1 g de muestra calcinada a 400°C durante 24 horas y disueltas en ácido clorhídrico (1:1). La determinación analítica de metales y elementos tales como Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn y Mn se analizan por espectrofotometría de absorción atómica de llama.

d. Residuo seco.

Consiste en desecar en la estufa, a 100 °C, un determinado peso de extracto durante un tiempo determinado. Se expresa en % (m/m) respecto a extracto inicial.

e. Materia extraíble con disolventes.

Cuando no existen métodos adecuados para valorar los principios activos de una droga mediante métodos físico – químicos, se determina la cantidad de materia extraíble con agua, alcohol, éter o disolventes orgánicos.

f. Residuos de productos fitosanitarios.

Se determinan por CCF, CGL ó HPLC (más adelante).

g. Contaminación microbiológica

Por lo general, la planta se contamina en el momento de la recolección, disminuyendo la tasa en el proceso de secado. Sin embargo, los procesos de manipulación de la planta (trituration, embalaje, almacenamiento, etc.) pueden aportar una contaminación suplementaria. Salvo excepciones, se permiten un máximo de 10^6 bacterias y 10^5 levaduras por gramo.

h. Contaminación radiactiva

La normativa europea permite unos niveles máximos de 600 beq/kg, pero se refiere a productos alimentarios, no específicamente a plantas medicinales.

i. Naturaleza y tasa de elementos extraños

Normalmente, las farmacopeas toleran hasta un máximo del 2%.

j. Metales pesados

Se aceptan los criterios establecidos para alimentos de origen vegetal, que son los siguientes.

Plomo	Máximo de 0,5 ppm para frutas y raíces
	Máximo de 1,2 ppm para vegetales verdes
Cadmio	Máximo de 0,1 ppm para frutos y vegetales verdes
	Máximo de 0,05 ppm para raíces
Mercurio	Máximo de 0,03 ppm para cereales

k. Índice de hinchamiento

Aplicable a drogas con mucílagos. Se define como el volumen en ml ocupado por 1 gramo de droga y mucílago después de su hinchamiento tras permanecer en contacto con un líquido acuoso. Por ejemplo, para el agar es > 15 , para la semilla de lino > 4 si es droga entera y $> 4,5$ si es en polvo.

l. Índice de refracción

Viene dado por la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad en la sustancia de ensayo. Para su determinación se emplea el refractómetro de Abbe. Es un valor útil para establecer la pureza de los aceites esenciales, cuyos valores figuran en muchas de las farmacopeas.

m. Poder rotatorio

El poder rotatorio de un líquido es el ángulo de giro del plano de polarización de la luz cuando se hace pasar un rayo de luz polarizada a través de una muestra de dicho líquido. Este giro puede ser en el sentido horario o antihorario.

n. Determinación de aceites esenciales.

Los métodos fundamentales para el análisis de aceites esenciales son los siguientes.

- Determinaciones físicas
 - Aroma
 - Peso específico
 - Índice de refracción
 - Desviación óptica (poder rotatorio)
 - Solubilidad en mezclas alcohol-agua (alcoholes rebajados)
- Determinaciones químicas
 - Índice de acidez libre
 - Índices de saponificación y éster
 - Determinación de aldehídos y cetonas
 - Formación de fenilhidrazonas
 - Formación de oximas
 - Formación de semicarbazonas
 - Método del bisulfito
 - Índice de acetilo
 - Técnicas cromatográficas: CCF, CGL, HPLC
 - Métodos espectroscópicos: UV, IR, GC-MS, NMR

B. ENSAYOS CUALITATIVOS.

a. Reacciones de coloración o precipitación.

Son reacciones simples específicas para un principio activo o componente característico de una droga, que actúa como identificador de la misma. Sirven para alcaloides, heterósidos, saponinas, flavonoides, taninos, etc.

Estos ensayos no siempre son aplicables, por las interferencias que pueden presentar otras sustancias presentes en la droga, pero son muy útiles debido a su sencillez y rapidez.

En general se llevan a cabo directamente sobre un extracto de la planta que suele ser el extracto alcohólico.

Por ejemplo, la aparición de un color **rojo** cuando se trata la **cáscara sagrada** (*Rhamnus purshiana*) con solución amoniacal, es debida a su contenido en **antraquinonas**, siendo esta coloración indicativa de su identidad (si no aparece, no es).

Del mismo modo, la **visnaga** (*Amni visnaga*) da una coloración **púrpura** cuando se adiciona KOH al residuo de la evaporación de su extracto alcohólico, debido a las **furocromonas** que contiene.

Los **heterósidos cianogenéticos** de la **almendra amarga** (*Prunus amygdalus* var. *amara*) se determinan con papel picrócido que adquiere un tono **rojizo**, lo que la distinguen de la dulce (*Prunus amygdalus* var. *dulcis*).

Por último, cabe señalar la reacción de **Liebermann**, que es específica de **esteroides**, dando una coloración **azul – verdosa**.

b. Reacciones de fluorescencia.

Por ejemplo, la raíz de ruibarbo (*Rheum palmatum*, *R. officinale*) se diferencia de la falsificación con raíz de rapóntico (*R. rhaponticum*) porque esta última produce una fluorescencia azul – violácea a 366 nm, debido a que contiene una sustancia, raponticina, ausente en la droga oficial

c. Análisis Cromatográfico

Las técnicas cromatográficas se basan en la separación de las sustancias presentes en una mezcla compleja al poner ésta en contacto con una fase móvil (líquido o gas) y otra estacionaria (sólida o líquida) que permanece fija. Las sustancias van a migrar a través de la fase estacionaria arrastradas por la fase móvil, a distinta velocidad según su afinidad o solubilidad en una u otra fase. Las sustancias más afines por la fase estacionaria migrarán más despacio, y las más afines por la fase móvil, más deprisa. Ajustando los parámetros cromatográficos, conseguiremos separar todos los componentes. Los tres tipos más comunes son la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (CGL) y la de líquidos (HPLC).

i. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se emplea en controles de todo tipo de productos naturales, habiéndose establecido como método analítico muy importante en las farmacopeas modernas. Permite identificar de forma

rápida y bajo coste los componentes presentes en un determinado material vegetal. También se puede emplear como método semicuantitativo.

ii. Cromatografía de Gases (CGL)

La cromatografía de gases o cromatografía gas – líquido (CGL) se emplea para sustancias volátiles o volatilizables, como son los **aceites esenciales**. Se emplea como fase móvil un gas, y como fase estacionaria un líquido contenido en una columna capilar, de diámetro muy pequeño y varios metros de longitud, que va enrollada en el interior del cromatógrafo. Se trabaja a alta temperatura, para que los componentes de la mezcla se mantengan volatizados.

Es la técnica más selectiva y la recomendada por la Farmacopea Europea como el método estándar para el análisis los mismos. Permite separar e identificar aceites esenciales, alcanfor, ácidos vegetales, algunos alcaloides como los del opio y tabaco, resinas de cannabis, y compuestos esteroideos como sapogeninas y heterósidos cardiotónicos.

Es un método a la vez cuantitativo y cualitativo. Esta técnica, acoplada con Espectrometría de Masas (GC-MS), permite obtener el espectro de masas de cada componente, con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes.

Más recientemente se han desarrollado columnas cromatográficas quirales para la separación de componentes ópticamente activos.

iii. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

HPLC son las siglas en inglés de High Pressure Liquid Chromatography. Esta técnica permite separar e identificar moléculas de estructura química muy similar, incluso isómeros. Se aplica a compuestos no volátiles, como heterósidos, alcaloides, lípidos, esteroides, glúcidos, flavonoides, y a sustancias termolábiles, como las proteínas y vitaminas.

Tanto la fase móvil como la estacionaria son líquidas, de distinta polaridad, de modo que la separación de las sustancias ocurre en base a este parámetro. Se trabaja a temperatura ambiente, pero se bombean las fases móviles a presión.

El resultado en ambos casos (CGL y HPLC) es un cromatograma, que muestra los compuestos separados y el área del pico de cada uno de ellos, que es proporcional a su concentración.

d. Métodos espectrofotométricos

Muchos principios activos se pueden caracterizar químicamente a partir de los datos de cromatografía de gases y los espectros de masas tal como se anotó anteriormente, pero cuando existen dudas de tal caracterización se recurre a los métodos espectrales como Infrarrojo, Ultravioleta y Resonancia Magnética Nuclear.

i. Espectro infrarrojo

El espectro infrarrojo permite detectar la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, enlaces dobles C=C, etc. Para determinar el espectro basta con colocar una gota del componente en una celda de NaCl e introducirla en el

espectrofotómetro. El Espectro IR de una molécula es como su “DNI”, característico de ella, sólo, y se puede comparar con una base de datos de espectros.

ii. Espectro ultravioleta

El espectro UV permite el reconocimiento de grupos funcionales y grupos cromóforos (grupos químicos capaces de absorber en UV). Por ejemplo, el limoneno presenta un máximo de absorción en 262 nm.

En general, la espectrofotometría ultravioleta tiene una utilidad limitada en el estudio de la gran mayoría de los aceites esenciales terpénicos, ya que pocos terpenos tienen grupos cromóforos.

Sin embargo, en la fracción no volátil de los aceites esenciales cítricos se encuentran componentes carotenoides o con núcleos heterocíclicos oxigenados (cumarinas, furocumarinas sustituidas y polimetoxiflavonas), lo que da a estas esencias un comportamiento característico en el UV.

Esta particularidad se ha utilizado para la puesta a punto de métodos que permite evaluar la calidad y la genuinidad, identificar el origen geográfico de una muestra, la tecnología empleada para su extracción o la época de producción del aceite.

iii. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear

Gracias a los desarrollos de la NMR se cuenta con bases de datos de los espectros, especialmente del C^{13} (^{13}C -NMR) para los monoterpenos y sesquiterpenos más frecuentes.

iv. Espectrometría de Masas

En relación con el estudio de aceites esenciales el acoplamiento de la cromatografía de gases (CGL) a la Espectrometría de Masa (GC-MS) es el que ha recibido mayor atención desde su introducción. La técnica acoplada GC-MS permite obtener el espectro de masas de cada componente separado por CGL. Se obtiene el dato de su peso molecular e información estructural. Existen bases de datos con los espectros de masas para la identificación química de muchos de los componentes de un aceite esencial u otros tipos de sustancias.

12.5 BIBLIOGRAFÍA Y ENLACES

Bisset, N. G. (1994). Herbal drud and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientist basis. Medpharm Sientific Publishers, Stuttgart, U. K.

Bruneton, J. (2001) Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª Edición. Acribia, Zaragoza.

Evans, W. C. Pharmacognosy (14ª Ed.). WB Saunders, London, U. K.

Palomino, O. (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).