

Método cromatográfico HPTLC para control de fitomedicamentos

Martha Suárez¹, Alexander Venegas¹

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

Rev Fac Cien Med (Quito), 2016; 41 (1): 91-102

Recibido: 07/12/15; Aceptado: 18/12/15

Correspondencia:

Martha Suárez

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

masuarez@uce.edu.ec

Resumen

Objetivo: se estandarizó un procedimiento para comparar perfiles cromatográficos de extractos de plantas patrón con los correspondientes extractos de fitofármacos.

Métodos: los perfiles cromatográficos de cinco fitomedicamentos codificados se elaboraron en un cromatógrafo CAMAG, mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC). Los factores sometidos a estudio para la elaboración de los cromatogramas fueron: la polaridad del eluyente, tiempo de acondicionamiento de la placa cromatográfica y tiempo de saturación de la cámara cromatográfica. Las variables respuesta analizadas fueron: Rf y número de manchas separadas.

La corrida de los cromatogramas permitió definir el mejor sistema cromatográfico de separación mediante análisis de la razón de frentes (Rf) de los componentes presentes y del número de compuestos separados. Estos valores permitieron establecer la correspondencia entre el tipo y el número de compuestos separados. Se establecieron los porcentajes de compuestos que fueron coincidentes con el patrón de cada fitomedicamento; posteriormente se calcularon valores de chi cuadrado que permitieron definir si los fitomedicamentos tienen o no diferencia significativa con los patrones.

Resultados: se verificó que respecto a un patrón de igual composición, si se generaron pérdidas de compuestos durante el proceso de producción que ocasionan la disminución de los compuestos separados cromatográficamente mediante HPTLC.

Conclusiones: la pérdida de los compuestos en los fitofármacos analizados se encuentra en un rango que va desde 3,7% a 37,8% del total de los compuestos presentes en los patrones.

Palabras clave: perfil cromatográfico, cromatografía de capa fina de alta resolución, fitomedicamento

Abstract

Objective: we standardized procedure for comparing chromatographic profiles of pattern plant extracts with the corresponding herbal medicine extracts.

Design: five phytomedicament were coded to develop their chromatographic profiles in a chromatograph CAMAG by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). The study factors for the development of chromatograms were: the polarity of the eluent, preconditioning time of the chromatoplate and time saturation of the chromatographic chamber. The Rf and the number of separate spots were the response variables analyzed. The run of chromatograms, allowed to define the best chromatographic separation system, through analysis of the ratio of fronts (Rf) of the components present and the number of separate compounds. These values allowed to establish correspondence between the type and the number of separate compounds.

We established the matching percentages of compounds with the pattern of each phytomedicament, and chi-square values were calculated, which allowed to define whether the phytomedicament have or no significant difference with patterns.



Results: It was verified that with respect to a pattern of the same composition, compounds losses are generated during the production process, which cause the declining of chromatographically separated compounds by HPTLC.

Conclusions: The loss of compounds in the phytopharmaceuticals analyzed is in a range from 3.7% to 37.8% of the compounds present in the patterns.

Keywords: chromatographic profile, high performance thin layer chromatography, phytomedicine

Introducción

En Ecuador, los medicamentos elaborados a base de plantas conocidos también como fitomedicamentos o productos naturales procesados ¹ son una alternativa a los medicamentos de síntesis. Por tratarse de matrices complejas, existen limitadas metodologías que permitan realizar controles sistemáticos, tanto de materias primas como de productos terminados. La mayor parte de técnicas usadas para el control de la composición son cualitativas por lo que son susceptibles de interpretaciones subjetivas. Siendo el control físico-químico una herramienta de vigilancia de los fármacos ², es necesario desarrollar metodologías que permitan disponer de parámetros aplicables a fitomedicamentos, a fin de verificar la identidad de las especies vegetales utilizadas en su elaboración, con las cuales se inscriben los fármacos para la obtención del registro sanitario y su posterior comercialización. Además, al disponerse de un método rápido, se facilitaría el control durante etapas del proceso productivo, el almacenamiento y la comercialización. Con la información que se genere, podrían tomarse acciones preventivas o correctivas para evitar la degradación de los componentes de los fármacos antes de llegar al consumidor.

Los costos de producción son determinantes para que los laboratorios fabricantes no comprueben la identidad de las especies vegetales que declaran en la etiqueta, teniéndose como consecuencia el no cumplimiento de las condiciones de calidad, seguridad y eficacia de los fitomedicamentos ².

La cromatografía de capa fina de alta resolución HPTLC permite caracterizar y cuantificar los compuestos presentes en mezclas complejas, lo cual posibilita la comparación entre fitomedicamentos y sus respectivos patrones de referencia ³. Un aporte primordial de la cromatografía de capa es la obtención de resultados que se analizan y comparan estadísticamente.

Para investigar las especies vegetales que componen los fitomedicamentos, se desarrolló una metodología estandarizada de obtención de perfiles cromatográficos mediante cromatografía de capa fina de alta

resolución (HPTLC), la cual puede utilizarse como parámetro de referencia en los análisis físico-químicos durante el control posregistro. La metodología propuesta se convierte en una evidencia fotográfica comparativa del medicamento evaluado y sus patrones, los cuales, mediante pruebas estadísticas de contraste, definen cualitativamente la composición de los fitofármacos. La metodología desarrollada es una contribución a la regulación y control de los componentes presentes en muestras y extractos vegetales, que garantizará la producción de fitomedicamentos con calidad, seguridad y eficacia.

Material y métodos

Se seleccionaron, de acuerdo con su actividad biológica y nivel de venta medida por la encuesta de comercialización basada en la metodología de la "Military Standard 105" ⁴, a cinco fitomedicamentos expendidos en la ciudad de Quito; de forma simultánea se obtuvieron muestras patrones de los proveedores de materia prima. Los patrones utilizados correspondieron a plantas del mismo lote utilizado en la elaboración de los fitomedicamentos, a fin de evitar variabilidad derivada de las diferentes condiciones de cultivo, cosecha y manejo postcosecha.

Las muestras codificadas de fitomedicamentos y sus patrones de referencia registraron una humedad relativa del 11%; fueron tamizadas en una malla de 0,84 mm y se extrajeron por maceración con metanol al 96% en una relación P/P (1:7) sólido:solvente durante 72 horas. Los extractos totales se evaporaron en una estufa de convección BINDER a 40°C hasta alcanzar la sequedad y un peso constante. De cada extracto seco, se prepararon 100 µL de solución de concentración aproximada de 50 mg/mL, utilizando metanol como solvente; las soluciones se filtraron a través de membrana. La elaboración de los extractos, consideró la composición denunciada en la fórmula unitaria de cada fitomedicamento analizado (tabla 1).

Tabla 1. Fórmula unitaria de fitomedicamentos expresada en miligramos.

Código	Componentes	Peso
CN	<i>Gonolobus condurango</i>	500,0
	Excipientes c.s	50,0
	Peso total de la tableta	550,0
UL	<i>Aristeguieta glutinosa</i>	250,0
	<i>Gonolobus condurango</i>	50,0
	<i>Uncaria tomentosa</i>	100,0
	<i>Croton lechleri</i>	100,0
	Excipientes c.s	50,0
	Peso total de la tableta	550,0
UN	<i>Uncaria tomentosa</i>	100,0
	<i>Croton lechleri</i>	100,0
	Excipientes c.s	600,0
	Peso total de la tableta	800,0
FU	<i>Menta pulegium</i>	32,4
	<i>Plantago major</i>	32,4
	<i>Aristeguieta glutinosa</i>	32,4
	<i>Uncaria tomentosa</i>	32,4
	<i>Equisetum bogotense</i>	32,4
	Carbón vegetal	54,0
	Excipientes c.s	64,0
	Peso total de la cápsula	280,0
UF	<i>Piper carpunya</i>	100,0
	<i>Uncaria tomentosa</i>	100,0
	Excipientes c.s	0,0
	Peso total de la tableta	500,0

c.s cantidad suficiente.

Elaboración: autores

Con los extractos tratados, usando el programa Wincats ⁵, se corrieron perfiles cromatográficos de muestras y patrones de referencia en un sistema de cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) CAMAG (3,5). Previamente se definieron experimentalmente las condiciones detalladas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones experimentales del desarrollo cromatográfico por HPTLC.

	Parámetros	Condiciones de desarrollo
Pre-secado	Tiempo	5 minutos
Inyección	Volumen de la jeringa	100 µl
	Volumen de inyección	2 µl
	Velocidad de inyección	140 nl/seg
Control de humedad	Tiempo	10 minutos
	Solución	Sulfocianuro de potasio
	Volumen de llenado	800 ml
	Humedad relativa	50,1%
Secado	Tiempo	15 minutos
Saturación	Almohadilla de saturación	No
	Volumen fase móvil	25 ml
	Solvente	Tolueno: hexano: metanol
Desarrollo	Fase estacionaria	Silica gel F254 20x10 cm
	Distancia de migración	70,1 mm
	Volumen de fase móvil	10 ml
	Fase móvil	Tolueno: hexano: metanol

Elaboración: autores

Los cromatogramas desarrollados se foto documentaron a longitudes de onda de 254 nm y 366 nm. Los factores de estudio se definieron considerando las variables que tienen mayor incidencia en el desarrollo cromatográfico⁶, detallados en el tabla 3.

Tabla 3. Factores de estudio en la elaboración de perfiles cromatográficos.

Tiempo de saturación de la cámara cromatográfica	Tiempo de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica
S1: 5 minutos	T1: 5 minutos
S2: 20 minutos	T2: 20 minutos
Eluyente	
Composición	Polaridad (P')
E1: Tolueno: hexano: metanol (47,5:47,5:5)	142,25
E2: Tolueno: hexano: metanol (45:45:10)	169,50
E3: Tolueno: hexano: metanol (49:49:2)	125,9

Elaboración: autores

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño factorial 2 x 2 x 3 junto a un ANOVA (a x b x c) en el cual se tomó en cuenta el efecto de cada variable y la interacción de las mismas. Los datos permitieron determinar el mejor sistema cromatográfico ⁷, que permita obtener el mayor número de manchas separadas de los componentes presentes en los extractos totales, utilizando el Rf y el número de manchas separadas como variables respuesta.

Se usó como prueba demostrativa Tukey a un nivel de significancia del 95% para la polaridad de los eluyentes, en 3 niveles. Para el tiempo de acondicionamiento de las placas cromatográficas y tiempo de saturación de la cámara cromatográfica, se utilizó como prueba demostrativa la t de Student en 2 niveles con el 95% de significancia ⁸. Los cálculos se realizaron mediante el programa estadístico JMP[®].

Para contrastar las coincidencias de las muestras frente a su patrón de referencia, se empleó la prueba estadística chi-cuadrado (X^2), la cual compara si los resultados observados difieren significativamente de

los resultados esperados ^{8,9}, según la hipótesis nula que expone que la muestra analizada no tiene diferencia significativa frente a su patrón de referencia.

Resultados y discusión

Para las muestras patrón seleccionado y los fitomedicamentos codificados (ver tabla 4), se realizaron determinaciones de humedad residual, luego de ser sometidas a secado a 40°C, hasta obtener un peso constante. Los valores se encuentran dentro de los estándares de calidad para materias primas sólidas y producto terminado de acuerdo a la USP 35 ⁶, excepto para el fitomedicamento FU (cápsulas) que presenta una media de humedad relativa del 10,97 ± 0,37%. Este valor, de acuerdo a la norma, se encuentra sobre el límite superior permitido ⁶; las condiciones de humedad pueden ocasionar que el fitomedicamento presente riesgo que la reactivación enzimática genere degradación de los metabolitos, principalmente clorofilas ¹⁰.

Tabla 4. Resultados de humedad residual de patrones de referencia y fitomedicamentos.

Patrones de referencia	%HR
<i>Equisetum bogotense</i> L.	6,46 ± 0,12
<i>Gonolobus condurango</i> Triana	5,81 ± 0,08
<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	8,82 ± 0,21
<i>Plantago major</i> L.	4,64 ± 0,07
<i>Aristeguieta glutinosa</i> Llam.	5,74 ± 0,31
<i>Menta pulegium</i> L.	6,09 ± 0,11
<i>Croton lechleri</i> Mull.	3,90 ± 0,07
<i>Uncaria tomentosa</i> Will.	7,52 ± 0,01
Fitomedicamentos	% HR
CN	7,99 ± 0,16
UL	6,58 ± 0,05
UN	4,19 ± 0,20
UF	4,76 ± 0,17
FU	10,97 ± 0,37

%HR: porcentaje de humedad residual

CN, UL, UN, UF, FU: codificación de muestras de fitomedicamentos, de acuerdo a su nombre comercial

Elaboración: autores

Las fórmulas unitarias de los fitomedicamentos (ver tabla 1) se utilizaron para preparar las mezclas correspondientes a los patrones de referencia, con las cuales se obtuvieron los extractos. De esta manera, se asegura que en los análisis no se introduzca variabilidad debida a la diferente composición de los extractos usados como patrón en los corridos cromatográficos.

Definición del sistema cromatográfico: se definieron de acuerdo a las variables de estudio, los mejores sistemas cromatográficos para cada una de las muestras, comparadas con su patrón de referencia. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA y se utilizó la prueba de significancia de Tuckey. Se presenta el análisis realizado para el fitofármaco codificado como CN.

Fitomedicamento CN, cromatograma revelado a 254 nm: del análisis estadístico se determinó que el

mejor sistema para el desarrollo del cromatograma es: 5 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de preacondicionamiento de la placa cromatográfica y eluyente de polaridad $P^r=169,5$. Los resultados de la separación se presentan en la figura 1. No existe diferencia significativa en el número de manchas separadas, al utilizar un tiempo de saturación de la cámara cromatográfica de 20 minutos (ver figura 2), por lo que se eligió al sistema que demanda menor tiempo total para el desarrollo del cromatograma, lo cual permite optimizar el corrido.

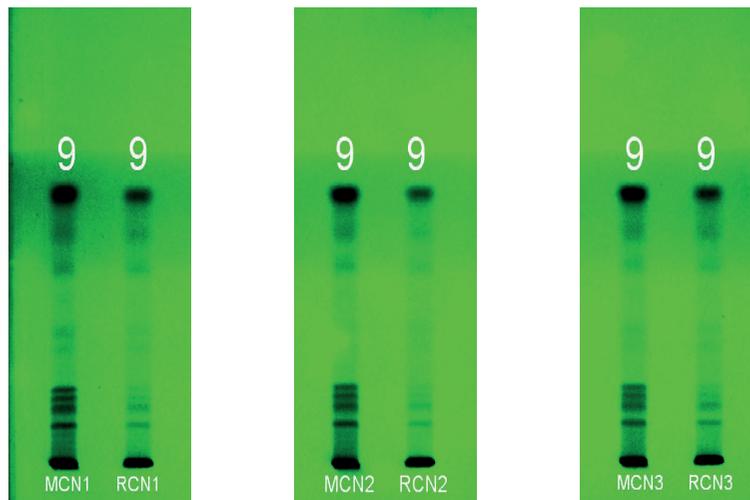


Figura 1. Placas cromatográficas correspondientes a las réplicas de MCN y RCN. MCN: Muestra CN; RCN: Patrón de referencia CN; 1, 2, 3. Número de réplica. Numeración superior correspondiente al número de manchas separadas.

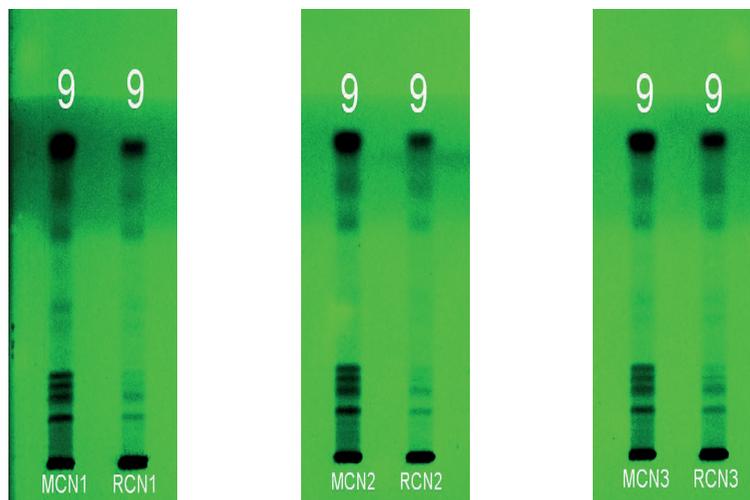


Figura 2. Placas cromatográficas correspondientes a las réplicas de MCN y RCN. MCN: Muestra CN; RCN: Patrón de referencia CN; 1, 2, 3: Número de réplica. Numeración superior correspondiente al número de manchas separadas.

Fitomedicamento CN, cromatograma revelado a 366 nm: del análisis estadístico se determina que el mejor sistema para el desarrollo del cromatograma es: 5 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de precondicionamiento de la placa cromatográfica y eluyente de polaridad $P^r=169,5$. Los resultados de la separación se presentan en la figura

3. No existe diferencia significativa en el número de manchas separadas, al utilizar un tiempo de saturación de la cámara cromatográfica de 20 minutos (ver figura 4), por lo que se eligió al sistema que demande menor tiempo total para el desarrollo del cromatograma que permita optimizar el corrido.

Figura 3. Placas cromatográficas correspondientes a las réplicas de MCN y RCN. MCN: Muestra CN; RCN: Patrón de referencia CN; 1, 2,3: Numero de réplica. Numeración superior correspondiente al número de manchas separadas.

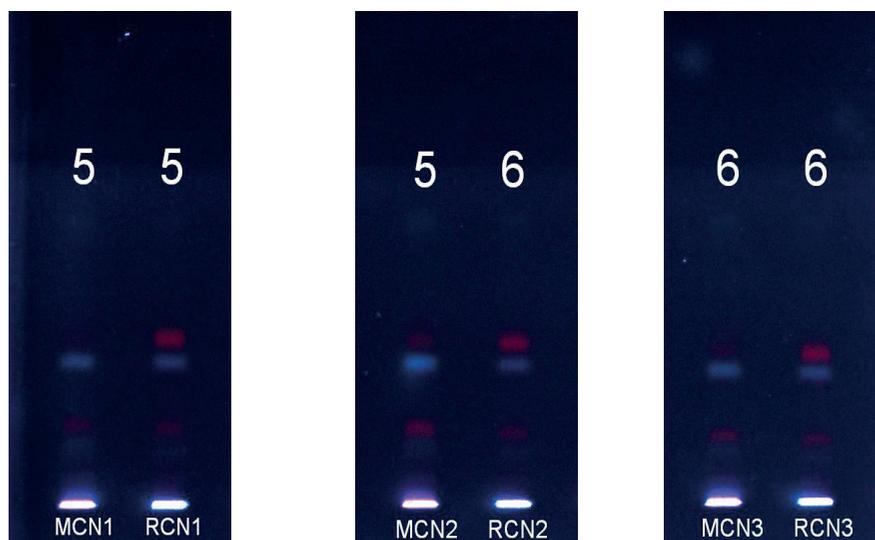
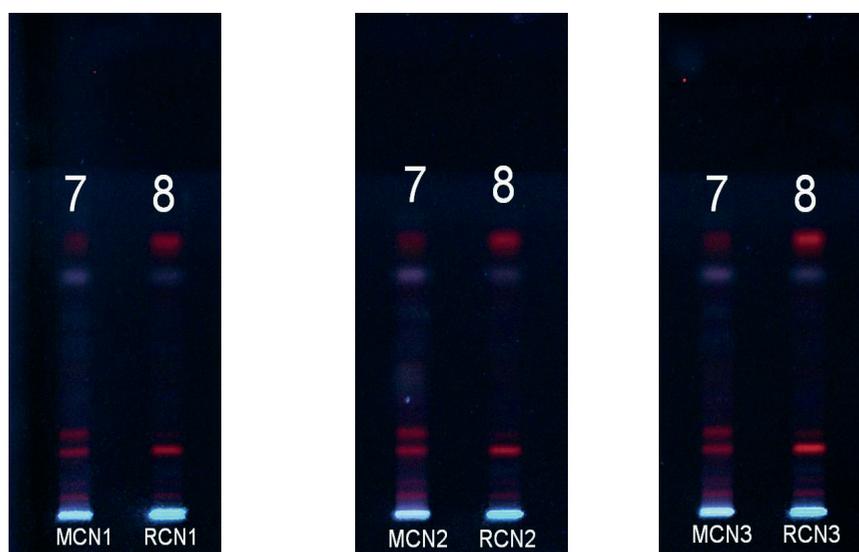


Figura 4. Placas cromatográficas correspondientes a las réplicas de MCN y RCN. MCN: Muestra CN; RCN: Patrón de referencia CN; 1, 2, 3: Numero de réplica. Numeración superior correspondiente al número de manchas separadas.



Mediante un análisis similar, se establecieron los sistemas cromatográficos para los medicamentos codificados como UL, UN, FU y UF; los resultados se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Sistemas de desarrollo cromatográfico para fitomedicamentos de estudio.

Código fitomedicamento	Sistema para desarrollo cromatográfico
CN ₂₅₄	5 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica, eluyente de polaridad P'=169,5
CN ₃₆₆	5 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica, eluyente de polaridad P'=169,5.
UL ₂₅₄	20 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica, eluyente de polaridad P'=169,5
UL ₃₆₆	5 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 5 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica, eluyente de polaridad P'=169,5
UN ₂₅₄	No definido
UN ₃₆₆	No definido
FU ₂₅₄	20 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica, eluyente de polaridad P'=169,5
FU ₃₆₆	5 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica, eluyente de polaridad P'=169,5
UF ₂₅₄	20 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 5 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica, eluyente de polaridad P'=169,5
UF ₃₆₆	5 minutos de saturación de la cámara cromatográfica, 20 minutos de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica , eluyente de polaridad P'=169,5

Elaboración: autores

De acuerdo a los resultados presentados en el cuadro 5, se definió un sistema de separación cromatográfica para un 80% de los fitomedicamentos analizados, que cumplen con la proporción de excipientes permitida por la norma ¹¹. En el 20% de productos analizados (cuadro 1, fitomedicamento UN), la proporción de excipientes se encuentra en niveles superiores a los permitidos. Se pudo observar experimentalmente que el exceso de excipientes incide en la extracción de los componentes vegetales, obteniéndose extractos de baja concentración de principios activos y un alto contenido de almidones, cuyos componentes no pueden ser detectados por el

cromatógrafo en las condiciones experimentales establecidas.

Análisis de razón de frentes (Rf).

Fitomedicamento CN cromatograma, revelado a 254 nm: mediante el cálculo de los valores de Rf en el cromatograma revelado a 254 nm, se puede verificar que los compuestos presentes en el fitomedicamento comparados con su patrón de referencia son similares. En la tabla 6 se presentan los valores de Rf que son comparados con el valor correspondiente al patrón. Se debe anotar que existen compuestos (figuras 1 y 2) que no corresponden

a aquellos presentes en el patrón, lo cual indica que se generaron durante el procesamiento del medicamento o en su almacenamiento. Esta situación puede generar degradación o cambios estructurales en los compuestos, que se ven reflejados en la presencia de manchas adicionales a las existentes en el patrón de referencia.

De acuerdo a los datos de la tabla 6, la media de manchas coincidentes determinada a partir de la comparación de los Rf es $96,3 \pm 6,4\%$; se comprueba que el método permite definir comparativamente los compuestos presentes en los fitomedicamentos y en su patrón de referencia a partir de este parámetro.

Tabla 6. Valores de Rf de muestra (MCN) y su patrón de referencia (RCN) cromatograma revelado a 254 nm.

# Mancha	MCN1	RCN1	MCN2	RCN2	MCN3	RCN3	Promedio M	Promedio R
1	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87±0,00	0,87±0,00
2	0,75	0,75	0,75	0,75	0,74	0,74	0,75±0,01	0,75±0,01
3	0,63	0,63	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64±0,01	0,64±0,01
4	0,44	0,44	0,45	0,44	0,43	0,43	0,44±0,01	0,44±0,01
5	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38±0,00	0,38±0,00
6	0,25	0,25	0,26	0,26	0,25	0,25	0,25±0,01	0,25±0,01
7	0,22	0,22	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22±0,01	0,22±0,01
8	0,19	0,19	0,20	0,20	0,19	0,19	0,19±0,01	0,19±0,01
9	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14±0,01	0,14±0,01
% coincidencias	100,0		88,9		100,0			

MCN: Muestra CN; RCN: Patrón de referencia CN; 1, 2, 3: Numero de réplica.

Elaboración: autores

Fitomedicamento CN cromatograma, revelado a 366 nm: el análisis realizado en el cromatograma revelado a 366nm establece de manera análoga, que los compuestos presentes en la muestra CN de fitomedicamento comparados con su patrón de referencia

son similares, por presentar iguales valores de Rf (tabla 7). De igual manera se notan compuestos que no existen en el patrón que son el resultado de cambios en la muestra durante procesamiento o almacenamiento del medicamento.

Tabla 7. Valores de Rf de muestra (MCN) y su patrón de referencia (RCN) cromatograma revelado a 366 nm.

# Mancha	MCN1	RCN1	MCN2	RCN2	MCN3	RCN3	Promedio M	Promedio R
1	0,79	0,79	0,81	0,81	0,80	0,80	0,80±0,01	0,80±0,01
2	0,69	0,69	0,71	0,71	0,70	0,70	0,70±0,01	0,70±0,01
3	0,63	0,63	0,26	0,26	0,63	0,63	0,51±0,21	0,51±0,21
4	0,26	0,26	0,21	0,22	0,24	0,24	0,24±0,03	0,24±0,03
5	0,21	0,21	-	0,16	0,20	0,20	0,21±0,12	0,19±0,12
6	-	0,15	0,13	0,13	-	0,14	0,13±0,08	0,14±0,08
7	0,12	0,12	0,09	0,09	0,11	0,11	0,11±0,02	0,11±0,02
8	0,08	0,08	-	-	0,07	0,07	0,08±0,04	0,08±0,04
% coincidencias	87,5		71,4		87,5			

MCN: Muestra CN; RCN: Patrón de referencia CN; 1, 2, 3: Numero de réplica.

Elaboración: autores

De acuerdo a los datos de la Tabla 7, la media de manchas coincidentes determinada a partir de la comparación de los Rf es $82,1 \pm 9,3\%$; el método escogido permite definir comparativamente los compuestos

presentes en los fitomedicamentos y su patrón de referencia a partir de éste parámetro.

Análisis similares se realizaron para todos los fitomedicamentos estudiados, obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de manchas coincidentes, de acuerdo a la comparación de Rf. Cromatogramas revelados a 366 y 254 nm.

Código fitomedicamento	Porcentaje de coincidencias	
	366 nm	254 nm
CN	$82,1 \pm 9,3$	$96,3 \pm 6,4$
UL	$80,0 \pm 0,0$	$70,8 \pm 7,2$
UN	No determinado	
FU	$62,2 \pm 3,8$	$62,5 \pm 12,5$
UF	$78,6 \pm 0,0$	$69,4 \pm 4,8$

Elaboración: autores

El porcentaje de coincidencias define tanto la clase como el número de compuestos separados en un fitomedicamento, comparados con su patrón de referencia; esta coincidencia establece la similitud química de los compuestos separados.

Test de chi-cuadrado: los valores presentados en la tabla 3 por sí solos, no definen si se acepta o niega la hipótesis planteada. El test estadístico chi-cuadrado determina si la muestra se encuentra dentro de los parámetros definidos por el patrón de referencia, estableciendo si existe una diferencia significativa entre la muestra (fitomedicamento) y el patrón. La interpretación del análisis estadístico, determinará si los componentes presentes en muestras vegetales individuales o en las mezclas antes de ser procesadas, se mantienen como parte integrante de un fitomedicamento una vez que han sido sometidos a

un proceso industrial de producción y almacenamiento.

De acuerdo a esta metodología estadística se procedió a establecer esta relación, utilizando el valor de chi-cuadrado como la diferencia significativa que existe entre la muestra y su correspondiente patrón, para los fitomedicamentos de estudio. La comparación considera que para un sistema cromatográfico definido, el patrón presenta el 100% de los compuestos separados mientras que el fitomedicamento con igual composición y evaluado en similares condiciones al patrón, puede presentar pérdidas de compuestos debidas al procesamiento. Realizado el cálculo, se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de chi-cuadrado (X^2) calculados. Cromatogramas revelados a 366 y 254 nm.

Código fitomedicamento	X^2	
	366 nm	254 nm
CN	5,9	0,1
UL	4,0	8,5
UN	No determinado	
FU	14,3	14,1
UF	4,6	9,4

Valor tabulado de X^2 para 2 grados de libertad 5,99 (9)

Elaboración: autores

Valores de chi-cuadrado menores al valor tabulado para los correspondientes grados de libertad, permiten aceptar la hipótesis planteada y afirmar que la muestra se encuentra dentro de los parámetros definidos por el patrón de referencia. Estas características se cumplen en el 37,5% de los casos. Valores de chi-cuadrado mayores al valor tabulado para los correspondientes grados de libertad, permiten negar la hipótesis planteada y afirmar que la muestra no se encuentra dentro de los parámetros definidos por el patrón de referencia. Estas características se cumplen en el 62,5% de los casos.

Si las muestras son sometidas a un proceso productivo que involucra tienen etapas de la producción (limpieza, desinfección, secado, molienda, tamizaje, elaboración de la forma farmacéutica, envasado, etiquetado y almacenaje), el análisis realizado durante las distintas etapas del proceso productivo puede facilitar la determinación de los puntos críticos en los que se debería poner énfasis para mejorar el control de calidad y evitar cambios estructurales ocasionados por degradación que afecten sensiblemente los componentes de los fitofármacos.

Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos para la selección del sistema cromatográfico, se determinó que los factores que poseen influencia significativa con un 95% de confianza sobre las respuestas (R_f y número de manchas separadas) en el método cromatográfico utilizado son: a) el precondicionamiento de la placa, b) el tiempo de saturación de la cámara cromatográfica y c) la polaridad del eluyente. El precondicionamiento asegura que la placa presente el mayor número de puntos activos, mientras que la saturación de la cámara homogeniza el ambiente interno con los vapores de la fase móvil favoreciendo la capilaridad mientras que la polaridad del eluyente asegura una

óptima separación entre bandas. Para cada muestra utilizada en el estudio se definió un sistema cromatográfico particular (cuadro 5). Se desarrolló un método cromatográfico que permite establecer estadísticamente si los componentes vegetales de un fitomedicamento luego del proceso de producción conservan su integridad dentro de la forma farmacéutica que será expandida. Se verificó que respecto de un patrón de igual composición, se generan pérdidas de compuestos durante una de las etapas del proceso de producción, ocasionando disminución de los compuestos separados cromatográficamente mediante HPTLC. La pérdida de los compuestos en los fitofármacos analizados se encuentra en un rango que va desde el 3,7% al 37,8% del total de los compuestos presentes en los patrones. El desarrollo del método no incluyó la validación, la misma que se realizará en una etapa posterior. Si acepta como normal que existan pérdidas de los componentes activos en los procesos productivos; al emplear como método de control la HPTLC durante el proceso y postproceso de producción de un fitofármaco, se asegurará que los componentes de los cuales dependa la actividad terapéutica del fitomedicamento no pierdan su integridad al atravesar una línea de producción. Adicionalmente, el uso de HPTLC puede convertirse en una herramienta útil para el control posregistro que permita verificar la vida útil de fármacos elaborados a base de plantas.

Conflictos de interés

Ninguno declarado por los autores.

Financiamiento

Universidad Central del Ecuador a través de los fondos para investigación semilla.

Referencias

1. MSP. Registro Oficial 385. Quito, Pichincha. 2006.
2. OMS. Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. Informe 34. Singapore: WHO Library. 1996
3. Srivastava M. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). Berlín: Springer, 2011.
4. Instituto Nacional de Estadística y Censos, Anuario de estadísticas hospitalarias: Camas y egresos. Quito: Imprenta del INEC; 2014.
5. CAMAG. Manual de operación de CAMAG VideoScan 1909D001 1.02. Suiza: 1997.
6. The United States Pharmacopeial Convention. Primer Suplemento de USP 38-NF33 Artículos Botánicos. USP 38. Baltimore: United Book Press, Inc; 2015: 1-11.
7. CAMAG. Instrumental Thin-Layer Chromatography. Suiza: 2014.
8. Miller J, Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Madrid: Pearson Educación S.A.; 2002.
9. Montgomery. Análisis Estadístico. México: Mc Graw Hill; 2003: 145-168.
10. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafe de Bogotá: Quebecor-Impreandes; 2000.
11. Vila, José. Tecnología Farmacéutica Volumen II: Formas Farmacéuticas. Madrid: Síntesis; 2001.