

Desarrollo y aplicación de métodos para el control de calidad de principios activos en cosmética y parafarmacia

Grado en Ingeniería Química

Jorge Miró Pérez

Director: Antonio Arques Sanz

Codirectora: Ana María Amat Payá

Contenido

1.	Introducción	7
1.1. Industria cosmética.....		8
1.2. Industria parafarmacia.....		8
1.3. Control de Calidad en la industria cosmética y de parafarmacia.		10
1.4. Métodos utilizados en el análisis de principios activos de cosméticos y parafarmacia		12
1.4.1. Control analítico		12
1.5. Principios activos.....		15
1.5.1. HETERÓSIDOS		15
1.5.2. POLIFENOLES		16
1.5.3. TERPENOIDES:.....		16
1.5.4. ALCALOIDES:		17
1.5.5. MUCÍLAGOS Y GOMAS:		18
2. Objetivos.....		19
3. Experimental.....		20
3.1. Reactivos, productos y equipos		20
3.1.1. Reactivos y patrones:		20
3.1.2. Equipos		20
4. Desarrollo de los métodos y aplicación		23
4.1. Análisis del producto Árbol del té		23
4.1.1. Extracción de los aceites esenciales.....		23
4.1.2. Preparación de los patrones		23
4.1.3. Análisis de los aceites esenciales		23
4.1.4. Tiempos de retención patrones		25
4.1.5. Rectas calibración patrones		27
4.1.6. Análisis muestras		31
4.2. Análisis del producto Hipérico		37
4.2.1. Extracción de la hipericina		37
4.2.2. Cálculo del % humedad		40
4.2.3. Análisis de la hipericina		40
4.3. Análisis de un producto solar		42
4.3.1. Extracción		42
4.3.2. Extracción β -Caroteno.....		42
4.3.3. Extracción α -Tocoferol		43



4.3.4.	Cálculo del % humedad	43
4.3.5.	Preparación de patrones	43
4.3.6.	Análisis de β -Caroteno y α -Tocoferol.....	43
4.3.7.	Rectas calibrado patrones β -Caroteno y α -Tocoferol.....	46
4.3.8.	Resultados análisis β -Caroteno y α -Tocoferol	47
5.	Estudio de los costes	48
5.1.	Costes Árbol del té.....	48
5.2.	Costes Hipérico	49
5.3.	Costes producto solar	50
5.4.	Coste total	52
6.	Tratamiento de los residuos.....	53
7.	Conclusiones.....	54
7.1.	Árbol del té.....	54
7.2.	Hipérico	54
7.3.	Solar.....	54



AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado este TFG, me gustaría agradecer a todas las personas que me han acompañado durante esta etapa de mi vida el apoyo recibido, pues han sido muchas las aportaciones, tanto profesionales como personales.

En primer lugar me gustaría darle las gracias al director de mi trabajo, Antonio Arques Sanz, por su paciencia y ayuda diaria, ya que sin él no me hubiera sido posible aprender todas las técnicas utilizadas.

A la empresa Korott S.L., al personal del laboratorio en particular, y al departamento de Ingeniería Textil y Papelera de la Escuela Politécnica Superior de Alcoy por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, que siempre me han ayudado y resuelto mis dudas durante el día a día: Sara García, Lucas Santos-Juanes, Juan Gomis y Julio Sanz.

A mis compañeros de clase, por todo lo vivido juntos y porque habéis hecho de estos años una vivencia inmejorable.

A mi madre y a mi hermana, Macu y Nuria, por su ayuda, sus ánimos y su apoyo incondicional, sin vosotras nunca hubiera sido posible realizar este trabajo.

Muchas gracias a todos.

Resumen

El proyecto siguiente consiste en el desarrollo y aplicación de métodos para el control de calidad de principios activos en cosmética y parafarmacia, y surge a raíz de unas prácticas en empresa, la cual ha sido la encargada de proporcionar los productos sobre los cuales se han desarrollado los métodos.

Se han desarrollado tres métodos, y para cada uno de ellos se han empleado técnicas distintas en función de las necesidades. De esta manera, para el análisis de aceites esenciales se ha empleado la cromatografía de gases – espectrometría de masas, para la hipericina se ha empleado la espectrofotometría, y para los compuestos β -Caroteno y α -Tocoferol se ha utilizado la cromatografía líquida de alta eficiencia. La selección de las técnicas ha estado condicionada por el cumplimiento de la Farmacopea Europea en los métodos en que se ha podido disponer de ella, y por bibliografías alternativas en caso contrario.

Una vez desarrollados los métodos se han aplicado y se han obtenido resultados cualitativos y cuantitativos de los productos analizados, tomándolos como punto de partida para el estudio de estabilidad de los mismos.



Resum

El projecte següent consisteix en el desenvolupament i aplicació de mètodes per al control de qualitat de principis actius en cosmètica i parafarmàcia, i sorgeix arran d'unes pràctiques en empresa, la qual ha estat l'encarregada de proporcionar els productes sobre els quals s'han desenvolupat els mètodes.

S'han desenvolupat tres mètodes, i per a cadascun d'ells s'han emprats tècniques diferents en funció de les necessitats. D'aquesta manera, per a l'anàlisi d'olis essencials s'ha emprat la cromatografia de gasos - espectrometria de masses, per a la hipericina s'ha emprat la espectrofotometria, i per als compostos β -Caroteno i α -Tocoferol s'ha utilitzat la cromatografia líquida d'alta eficiència. La selecció de les tècniques ha estat condicionada pel compliment de la Farmacopea europea en els mètodes en què s'ha pogut disposar d'ella, i per bibliografies alternatives en cas contrari.

Un cop desenvolupats els mètodes s'han aplicat i s'han obtingut resultats qualitius i quantitius dels productes analitzats, prenent-los com a punt de partida per a l'estudi d'estabilitat dels mateixos.

Abstract

The next project consists in the development and application of methods for quality control of active ingredients in cosmetics and pharmacy, and stems from the practices made in a company, which has been responsible to provide the products on which methods have been developed.

Three methods have been developed, and have been employed different techniques for each one depending on the needs. Thus, for the analysis of essential oils has been used gas chromatography - mass spectrometry, for hypericin has been used spectrophotometry, and for β -Carotene and α -Tocopherol compounds has been used high performance liquid chromatography. The selection of techniques has been conditioned by the fulfillment of the European Pharmacopoeia in case it was available, and alternative bibliographies otherwise.

Once methods had been developed, those have been implemented and qualitative and quantitative results of the analyzed products have been obtained, taking them as a starting point for the study of their stability.

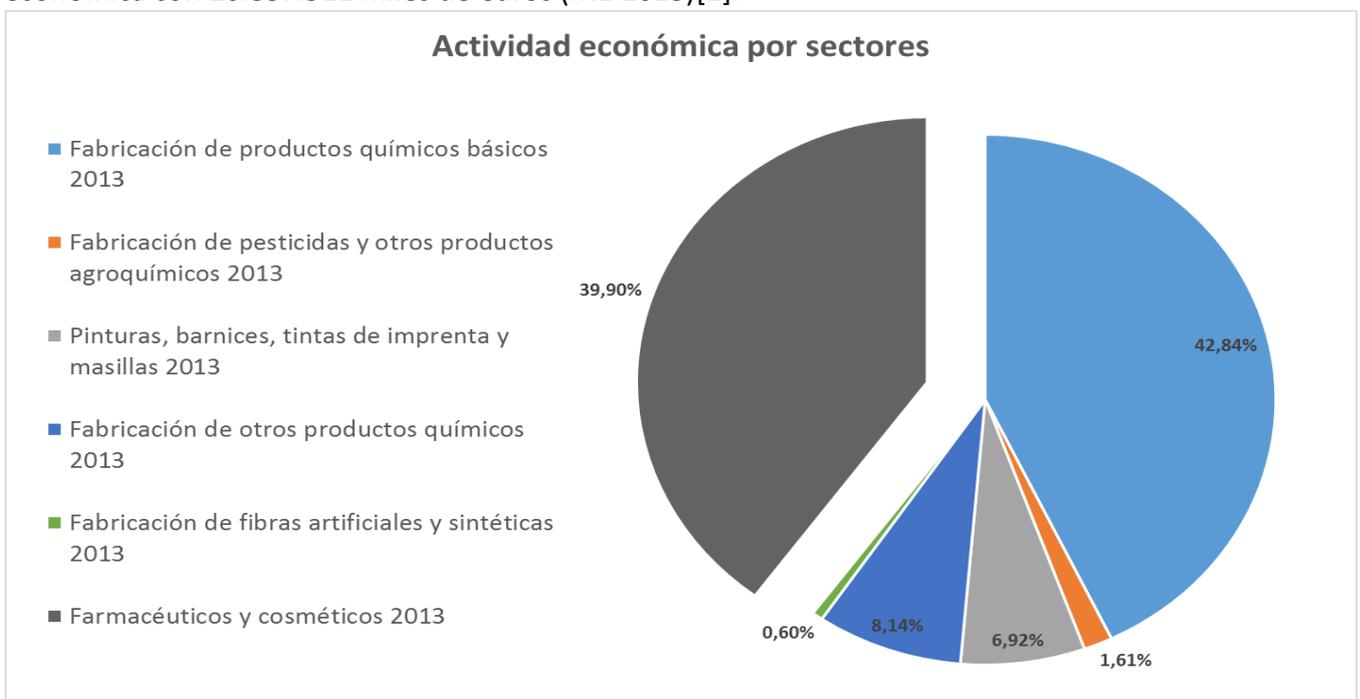
1. Introducción

La industria cosmética y la industria de la parafarmacia representan una parte importante de la economía, tanto de la española como de la europea. En España la industria química y farmacéutica representa un 9% de la actividad económica nacional con 52.227.378 miles de euros (INE 2013), tal y como se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1 Actividad económica nacional por sectores

Dentro de este sector, la industria cosmética y de parafarmacia supone el 39'9% de la actividad económica con 20.837.911 miles de euros (INE 2013)[1].



Gráfica 2 Actividad económica en el sector químico y farmacéutico

La creciente demanda de productos cosméticos y de complementos nutricionales de parafarmacia ha creado la necesidad de conocer en profundidad las características de los mismos, así como un estricto control de su composición. Para ello es necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan identificarlos y controlarlos.

1.1. Industria cosmética

Como cosmético se define: toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales. El término cosmético por lo tanto incluye maquillaje, desodorantes, champús, geles de ducha, etcétera. [Reglamento Europeo 1223/2009]

La industria cosmética es la segunda gran rama industrial surgida del desarrollo del conocimiento bioquímico durante el último siglo. En la actualidad, se trata de un sector que invierte anualmente grandes sumas de dinero en el lanzamiento y promoción de nuevos productos, así como en el reforzamiento y renovación de los atributos más destacados de las distintas formulaciones. Desde el punto de vista comercial, se trata de un mercado en el que interactúan laboratorios, farmacias y perfumerías, supermercados y grandes tiendas, profesionales de la salud, consejeros de belleza, las autoridades sanitarias y los consumidores, entre otros. [2]

Se estima que la industria factura a nivel mundial 170.000.000.000 de dólares anuales. Los principales mercados de consumo son la Unión Europea, Japón y EE.UU.

1.2. Industria parafarmacia

Según la normativa europea productos de parafarmacia son “todos aquellos productos, que no siendo medicamentos, se consumen, aplican o utilizan por el ser humano y/o sobre el cuerpo, y se ponen a disposición de los usuarios, de conformidad y con arreglo a lo que se establece, en las reglamentaciones técnico - sanitarias específicas de las distintas categorías de productos que existen en el mercado, así como en la normativa general vigente en la materia” [2].

Dentro de la calificación de Parafarmacia se encuentra una gran variedad de productos que se pueden incluir en los siguientes grupos:



- Cosméticos y productos de higiene personal
- Alimentos
- Productos Sanitarios y ayudas técnicas y P.S. de diagnóstico “in vitro”
- Artículos de puericultura
- Desinfectantes y biocidas para la higiene humana: acaricidas, repelentes y atrayentes para la higiene humana.
- Otros productos puestos a disposición de los consumidores

Los compuestos parafarmacéuticos tienen uno o varios principios activos acompañados de diversos excipientes. Por ello, es necesario conocer su concentración en el producto final, así como en las materias primas empleadas. Para ello hace falta la aplicación de métodos de control de calidad así como un análisis químico muy estricto.

1.3. Control de Calidad en la industria cosmética y de parafarmacia.

Entendemos el control de calidad cómo: todos los mecanismos, acciones y herramientas realizadas para detectar la presencia de errores. Consiste en la recolección y análisis de grandes cantidades de datos que después se presentan a diferentes departamentos para iniciar una acción correctiva adecuada. Todo producto que no cumpla las características mínimas para decir que es correcto, será eliminado, sin poderse corregir los posibles defectos de fabricación que podrían evitar esos costos añadidos y desperdicios de material. Para controlar la calidad de un producto se realizan inspecciones o pruebas de muestreo para verificar que las características del mismo sean óptimas.

Para controlar la seguridad y eficacia de los cosméticos se han desarrollado normativas legales en los principales países del mundo (Unión Europea, Estados Unidos, Japón, Australia, etc.). Cada país dispone de su propia legislación. El objetivo del control de calidad del producto cosmético terminado es asegurar tanto el cumplimiento de las especificaciones establecidas para la formulación como la conservación de las características y composición del producto en forma constante desde un lote de producción a otro.

El control de calidad en el sector cosmético tiene como fin asegurar que el producto final cumple con las siguientes características:

- Respetar integridad y funciones vitales de la piel,
- mantener un pH eudérmico (5,5 a 6,5),
- perfecta inocuidad microbiana y toxicológica,
- textura confortable.

Durante el control de calidad se realizan los siguientes controles Físico-químicos:

- pH,
- viscosidad aparente,
- peso específico,
- extensibilidad.

La norma ISO 22716 ofrece una guía para la gestión de los recursos humanos, técnicos y administrativos que pueden afectar a la calidad de un producto cosmético. La norma contempla los pasos que van desde la recepción de las materias primas hasta su expedición.

Control de calidad en la industria de la parafarmacia:

En Europa, el cumplimiento con las “Buenas Prácticas de Fabricación” (Good Manufacturing Practice, GMP) es obligatorio según el Reglamento 1223/2009. La norma ISO 22716 certifica el correcto cumplimiento.

Estas GMP se encuentran incluidas dentro del concepto de Garantía de Calidad y constituyen el factor que asegura que los productos se fabriquen de forma uniforme y controlada, de acuerdo al uso que se pretende dar a los productos y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. El objetivo principal de las GMP es disminuir los riesgos inherentes a toda producción farmacéutica.

1.4. Métodos utilizados en el análisis de principios activos de cosméticos y parafarmacia

Normalmente el control de calidad se puede dividir en tres secciones:

- Microbiológico
- Físico-químico
- Analítico

En estos tres grupos de control se utiliza el material de laboratorio habitual, pero el análisis de principios activos se lleva a cabo en último, el analítico. Así pues a continuación se hace una introducción a los métodos de mayor uso en el control analítico.

1.4.1. Control analítico

Tiene como finalidad el estudio de la composición química de una muestra, mediante diferentes métodos de laboratorio. Se divide en control analítico cuantitativo y control analítico cualitativo. La química analítica es la rama de la química encargada de este estudio.

1.4.1.1. Métodos químicos o clásicos

Los métodos químicos han sido utilizados tradicionalmente, ya que no requieren instrumentos muy complejos (tan solo pipetas, buretas, matraces, balanzas, entre otros).

Análisis volumétrico

Un reactivo llamado “valorante” o “titulador”, de volumen y concentración conocida (una solución estándar o solución patrón) se utiliza para que reaccione con una solución de analito, de concentración desconocida. Utilizando una bureta calibrada para añadir el valorante se determina la cantidad exacta que se ha consumido cuando se finaliza la valoración, y se determina mediante el uso de un indicador.

Análisis gravimétrico

Consiste en determinar la de un elemento o compuesto presente en una muestra, eliminando todas las sustancias que interfieren y convirtiendo el componente deseado en un compuesto de composición definida, que sea susceptible de pesarse. La gravimetría es un método analítico cuantitativo, que permite determinar la cantidad de sustancia midiendo el peso de la misma con una balanza analítica, sin llevar a cabo el análisis por volatilización.

1.4.1.2. *Métodos fisicoquímicos o instrumentales*

Los métodos fisicoquímicos requieren un instrumental más sofisticado, tal como equipos de cromatografía, cristalografía, etc.

Métodos espectrométricos:

Están basados en la interacción de la radiación electromagnética con un analito para identificarlo o determinar su concentración, y emplean técnicas que se dividen en técnicas espectroscópicas y en técnicas no espectroscópicas. Las técnicas espectroscópicas son aquellas en las que el analito sufre procesos de absorción, emisión o luminiscencia. El resto corresponde a técnicas no espectroscópicas. Dentro de los métodos espectroscópicos se encuentra la espectrometría de masas, también empleada en química orgánica para la elucidación de estructuras moleculares.

Métodos electroanalíticos:

Estudian un analito mediante la medida del potencial eléctrico (voltios) y/o la corriente eléctrica (Amperios) en una celda electroquímica, que contiene el analito. Estos métodos se pueden dividir en varias categorías dependiendo de qué aspectos de la célula son controlados y cuáles se miden. Las tres principales categorías son: potenciometría (se miden la diferencia de potenciales en el electrodo), coulombimetría (se mide la corriente de las celdas con el tiempo), y Voltamperometría (se mide la corriente de las celdas mientras se altera activamente el potencial de las celdas).

Métodos cromatográficos:

Se trata de un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos da como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y por tanto una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.

Actualmente la cromatografía es uno de los métodos más empleados. Existen varios tipos de cromatografía, a continuación se describen los de mayor uso:

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la HPLC el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente

dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , donde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . Las fases estacionarias o columnas tienen un diámetro interno que varía entre 2 y 60 mm dependiendo de su utilización, a escala analítica o semipreparativa, y su longitud varía entre 5 y 30 cm. También existen columnas de pequeño diámetro, con diámetros comprendidos entre 2 y 0,5 mm y longitudes entre 25 y 100 cm.

Cromatografía de gases

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La pureza de los gases es sumamente importante, se requieren niveles 4.5 o mayores es decir 99.995 % de pureza. Las columnas más empleadas son las capilares debido a su rapidez y eficiencia, su longitud es variable, de 2 a 60 metros, y están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Suelen enrollarse en una forma helicoidal para ser introducidas en el horno que las contiene.

1.5. Principios activos

Los principios activos son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos.

Existen en las plantas otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos.

Los principios activos se clasifican según su estructura química. A continuación se explican algunos de los principios activos que podemos encontrar con mayor frecuencia en los productos cosméticos y de parafarmacia.[4] [5]

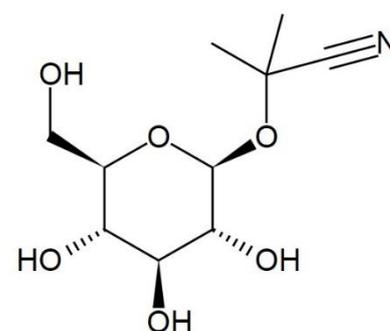
1.5.1. HETERÓSIDOS

Los heterósidos son moléculas de enorme variedad, constituidas por un glúcido unido a otra molécula no glucídica denominada aglucón. El enlace entre ambas partes es hidrolizable y debe romperse para que se active el compuesto; esta ruptura es catalizada por fermentos que contiene la misma planta. Constituyen los principios activos de muchas plantas y su actividad farmacológica se debe fundamentalmente a la parte no glucídica.

Los más importantes son los antraquinónicos, los cianogénicos, los cardiotónicos y los cumarínicos, recogidos en la Tabla 1. También los fenólicos, ya que es en este grupo en el que se encuentra la salicilina, precursora del ácido acetil salicílico, o aspirina. Se emplean, con frecuencia, en la industria farmacéutica.[6]

Tipo	Propiedades
Antraquinónicos	Purgantes
Cardiotónicos	Diuréticos. Tónico cardíaco
Cianogénicos	Anestésicos, anti-espasmódicos, hipotensores.
Cumarínicos	Antibacterianos, anticoagulantes y protectores solares
Fenólicos	Febrífugos y antipiréticos.
Flavonólicos	Fragilidad capilar. Vitamina C
Ranunculósidos	Irritantes para la piel
Saponósidos	Hemólisis. Emolientes. Dermatitis.
Sulfurados	Antibióticos

Tabla 1 Tipos de heterósidos y propiedades principales



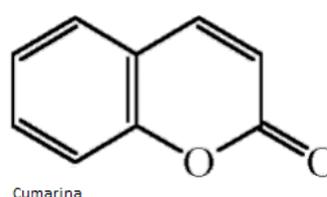
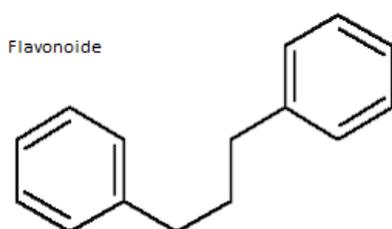
Glucósido cianogénico

1.5.2. POLIFENOLES

Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas.[7] [4]

Tipo	Estructura	Propiedades
Ácidos fenólicos	Aril-carboxílicos, con uno o más grupos OH en el arilo	Antioxidantes, analgésicos, coleréticos, antisépticos
Flavonoides	Tipo C6-C3-C6	Vasodilatadores, captadores de radicales libres y fitoestrogénicos
Cumarinas	2H-1-benzopirán-2-ona (Mayormente poseen un sustituyente OH en posición 7)	Tónico venoso, protector de pared celular, vasodilatador, anticoagulante y fotosensibilizantes
Lignanos	Resultante de la unión de 2 unidades de fenil propano (C6-C3)	Antitumoral y hepatoprotectores
Taninos	No clasificable (Mr entre 500 y 3000)	Antibacterianos, astringentes, antisépticos y vasoconstrictores.
Quinonas	Dicetonas aromáticas procedentes de la oxidación de fenoles	Antimicrobianas, antifúngicas, laxantes y purgantes

Tabla 2 Tipos de polifenoles, estructura y propiedades principales

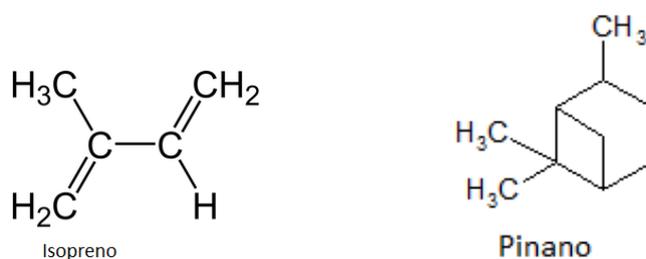


1.5.3. TERPENOIDES:

Los terpenoides están formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno (C5). Se hallan en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos cítricos. [8]

Tipo	Estructura	Propiedades
Aceites esenciales	Principalmente monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) y diterpenos (C20)	Antisépticos, antiespasmódicos, expectorantes, carminativos y eupépticos.
Iridoides	Monoterpénica	Antiinflamatorios, antimicrobianos, amebicidas.
Lactonas sesquiterpénicas	Sesquiterpénica	Antibacterianos, antifúngicos y característico sabor amargo.
Saponinas	Triterpénica y esteroidea	Poder espumante, tensioactivos naturales, propiedades hemolíticas.

Tabla 3 Tipos de Terpenoides, estructura y propiedades principales



1.5.4. ALCALOIDES:

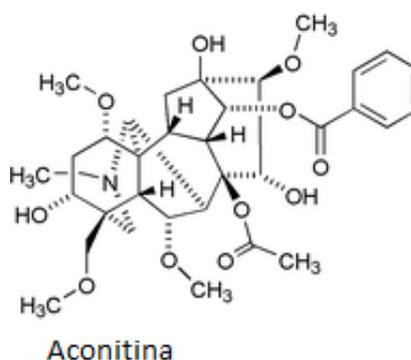
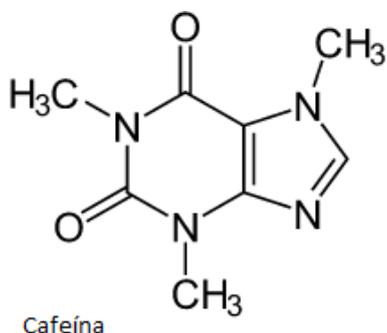
Grupo de productos naturales de mayor interés en la farmacognosia. Dentro de este grupo se encuentran sustancias tóxicas incluso a bajas dosis. El primer alcaloide aislado fue la morfina.

Son sensibles a la luz y el calor, se estabilizan con ácidos inorgánicos. En la naturaleza se encuentran en forma de sales aunque también libres. En las plantas se consideraba que eran productos obtenidos durante la extracción y poco solubles en los disolventes típicos de extracción por su polaridad. Pueden sufrir isomerización (ácido lisérgico a isolisérgico), racemización (hiosciamina a atropina). [9] [7]

Existen varios tipos según la molécula de la que deriven (tropano, quinoleína e isoquinoleína)

Clasificación según origen biosintético		
Tipo	Procedencia	Ejemplos
Alcaloides alifáticos	Ornitina	Pirrolidinas, tropánicos, pirrolizidínicos
	Lisina	Piperidinas, quinolizidínicos
Alcaloides aromáticos	Ácido nicotínico	Piridinas
	Fenilamina y tirosina	Isoquinoleínas
	Triptófano	Indólicos, quinoleínas
	Ácido antranílico	Quinoleínas
	Histidina	Imidazoles
Alcaloides de origen diverso	Terpénicos y esteroidales	Nufamina, evonina
	Diversos	Purinas, macrociclos, etc

Tabla 4 Clasificación de los alcaloides según su origen biosintético.



1.5.5. MUCÍLAGOS Y GOMAS:

Son polisacáridos heterogéneos, formados por diferentes azúcares y en general llevan ácidos urónicos. Se caracterizan por formar disoluciones coloidales viscosas, geles en agua. La diferencia entre goma y mucílago es difícil y se suele equiparar todo con gomas. Actualmente se considera que la diferencia está en que los mucílagos son constituyentes normales de las plantas, mientras que las gomas son productos que se forman en determinadas circunstancias, mediante la destrucción de membranas celulares y la exudación. Las más importantes están en la familia de las leguminosas. [10] [8]

2. Objetivos

El objetivo principal de este TFG es el desarrollo de métodos que permitan detectar y cuantificar los principios activos contenidos en diversos productos y el estudio de la estabilidad de los compuestos analizados, caracterizando su posible degradación con el tiempo. El objetivo principal se puede dividir en los siguientes objetivos específicos:

- El desarrollo de métodos que permitan realizar la extracción de principios activos de los productos desde diferentes matrices.
- El desarrollo de métodos que permitan el análisis cualitativo y cuantitativo de principios activos contenidos en el producto Árbol del té.
- El desarrollo de métodos que permitan el análisis cuantitativo y cualitativo del principio activo contenido en el producto Cápsulas de Hipérico.
- El desarrollo de métodos que permitan la extracción de los principios activos de un producto solar.
- El desarrollo de métodos que permitan el análisis cualitativo y cuantitativo de los principios activos contenidos en un producto solar.

3. Experimental

3.1. Reactivos, productos y equipos

3.1.1. Reactivos y patrones:

Tolueno 95%, n-hexano 99%, metanol 99'9%, acetonitrilo 99'9% y éter etílico 99'5% suministrados por Panreac. Tetrahidrofurano 99'9% suministrado por Sigma-Aldrich empleado como reactivo.

α -Pino 98'9%, α -Terpineno 91'3%, α -Terpineol 97'1%, aromadendreno 98'8%, cineole 92'5%, γ -Terpineno 99'3%, limoneno 97'9%, p-cimeno 99'6%, terpinen-4-ol 99'5%, terpinoleno 90'8%, β -Caroteno 94'9%, α -Tocoferol 98'6%. Todos ellos empleados como patrones sin modificación alguna y suministrados por Sigma-Aldrich. El agua utilizada en todos los procesos fue agua ultrapura suministrada por un equipo Milli-Q.

3.1.2. Equipos

Cromatografía de gases

Para la cromatografía de gases se ha empleado un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas GC-MS-QP2010S Shimadzu equipado con un detector de cuadrupolo. Como fase estacionaria se empleó una columna Meta.X5 (Polisiloxano con p-silfenileno, fase ligada y entrecruzada) de tamaño: 30 m x 0.25 x 0.25 μ m.



Ilustración 1 Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas GC-MS-QP2010S Shimadzu

Rampa de temperaturas empleada en los análisis

	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Columna	0-1	50
	1-37	50 → 230
	37-45	230
Puerto de inyección		240
Detector		240

Tabla 5 Rampa de temperaturas

Cromatografía de líquidos

Para la cromatografía líquida se ha empleado un Cromatógrafo Merck Hitachi serie LaChrom 7000, compuesto por un detector Diode Array L-7450A, un Autosampler L-7200 y una bomba cuaternaria Pump L-7100. Como fase estacionaria se ha utilizado una columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m).



Ilustración 2 Cromatógrafo Merck Hitachi serie LaChrom 7000

Espectrofotómetro

Para las medidas espectrofotométricas se ha utilizado el equipo Helios Epsilon Spectrophotometer.



Ilustración 3 Helios Epsilon Spectrophotometer

Centrifuga

El equipo utilizado para la centrifugación de muestras ha sido Eppendorf Centrifuge 5702, programado a cinco minutos y cuatro mil rpm.



Ilustración 4 Eppendorf Centrifuge 5702

Baño termostatzado

Se ha empleado el equipo Baño de agua con agitación Julabo SW22, a una temperatura de 70°C y con la agitación desactivada.

Otros equipos

También se ha utilizado un montaje de ebullición con reflujo clásico.

4. Desarrollo de los métodos y aplicación

4.1. Análisis del producto *Árbol del té*

Para realizar el análisis de este producto se han seguido las directrices de la Farmacopea Europea, la cual indica cómo debe realizarse la extracción de los compuestos, la rampa de temperaturas del cromatógrafo de gases, la preparación de los patrones y los compuestos que se deben analizar, así como los límites superiores e inferiores de los mismos.

4.1.1. Extracción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales que se quieren analizar se encuentran originalmente en disolución orgánica. La extracción se realiza disolviendo 0.15 ml del aceite esencial en 10 ml de hexano.

4.1.2. Preparación de los patrones

Para preparar los patrones se ha disuelto 0.10 ml del patrón en cuestión en 10 ml de hexano. Los patrones preparados han sido: α -Pino 98'9%, α -Terpineno 91'3%, α -Terpineol 97'1%, aromadendreno 98'8%, cineole 92'5%, γ -Terpineno 99'3%, limoneno 97'9%, p-cimeno 99'6%, terpinen-4-ol 99'5%, terpinoleno 90'8%. De manera adicional se ha preparado una disolución de referencia que reúne todos los patrones en una concentración próxima a la que se espera encontrar en la muestra problema. Para preparar esta disolución de referencia se ha añadido una cantidad determinada de cada uno de los patrones:

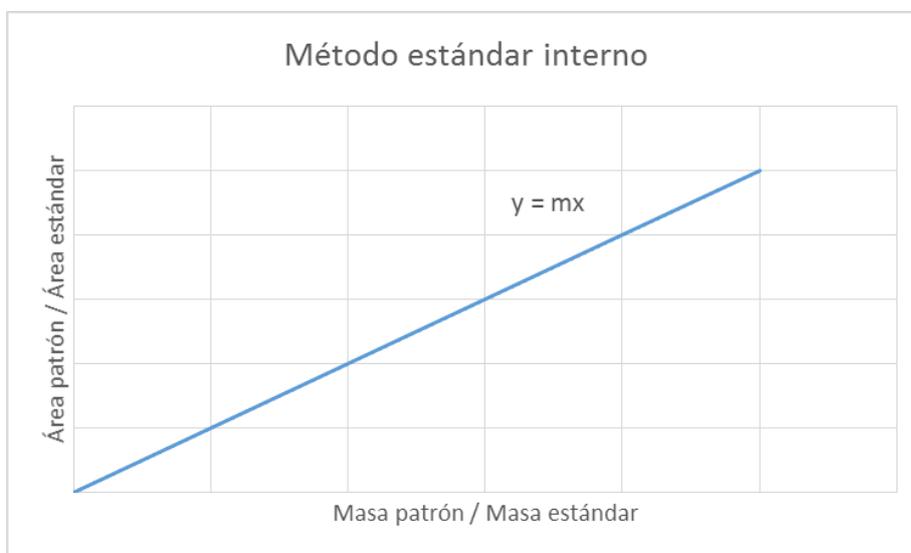
- 5 μ l de α -Pino 98'9%, 15 μ l de α -Terpineno 91'3%, 5 μ l de aromadendreno 98'8%, 5 μ l de cineole 92'5%, 30 μ l de γ -Terpineno 99'3%, 5 μ l de limoneno 97'9%, 5 μ l de p-cimeno 99'6%, 60 μ l de terpinen-4-ol 99'5%, 5 μ l de terpinoleno 90'8% y 5 mg de α -Terpineol 97'1% en 10 ml de hexano y 10 μ l de patrón interno.

4.1.3. Análisis de los aceites esenciales

Para realizar el análisis de los compuestos se ha empleado el equipo de cromatografía de gases indicado en el apartado 3.1. . Como fase estacionaria se ha empleado una columna Meta.X5 (Polisiloxano con p-silfenileno, fase ligada y entrecruzada) de tamaño: 30m x 0.25 x 0.2 5 μ m. El gas portador empleado fue helio con un flujo de 1.3 ml/min. En todos los análisis se ha inyectado un volumen de 3 μ l de manera manual mediante una jeringuilla Hamilton

Microliter™ #901 (Hamilton Co., Reno, Nevada); en el inyector la relación de Split fue de 1:50. El sistema cromatográfico está controlado por el software LabSolutions (Shimadzu Co.).

La identificación de los componentes se ha realizado mediante la comparación del tiempo de retención con patrones y/o con su espectro de masas. La cuantificación se ha realizado por el método de patrón interno, utilizando tolueno para ese fin. La decisión de utilizar un patrón interno se debe al error cometido en la inyección manual de la muestra en el equipo de cromatografía de gases, que hacía que el ensayo fuera irreproducible, impidiendo una cuantificación precisa. Puesto que uno de los objetivos consiste en realizar un estudio de estabilidad de los principios activos, la precisión en la cuantificación debe ser la máxima posible. Incorporando el tolueno en una concentración conocida a la muestra que queremos analizar eliminamos el error de inyección, puesto que relativizaremos todos los resultados al tolueno, cuya concentración conocemos. Estas relaciones de áreas son graficadas en función de las relaciones de masa.



Gráfica 3 Método estándar interno

Obtenemos la ecuación $y=mx$

Del cromatógrama se obtienen las áreas de analito y del estándar y luego con la ecuación de calibración y conociendo la masa del estándar se puede obtener la masa del analito en la muestra.

$$M_{analito} = \frac{\text{Área Patrón}}{\text{Área Estándar}} * \frac{M_{estándar}}{m}$$

El patrón interno ha sido añadido tanto en las muestras como en los patrones. El compuesto seleccionado ha sido Tolueno, ya que no interfiere con el resto de compuestos y

su tiempo de retención no coincide ellos. Se ha determinado la concentración absoluta de los compuestos mediante comparación con patrones, a partir de los cuales se ha realizado rectas de calibrado de tres puntos que permiten relacionar el área de los picos con la concentración de los compuestos, método conocido como estándar externo. Los patrones se inyectan separadamente de la muestra, en concentraciones los más próximas posibles a las esperadas en la muestra problema.

Por el método de normalización de áreas se ha obtenido el porcentaje en que se encuentran los compuestos. Para utilizar este método, se mide el área bajo cada pico individual. Sumando todas estas áreas de los picos se obtiene el área total calculada. El porcentaje en volumen de los componentes individuales se obtiene multiplicando el área calculada individual por 100 y luego dividiéndola entre el área total calculada. Es decir:

$$\%X = \left(\frac{A_x}{\sum_i A_i} \right) * 100$$

donde, A_x es el área del componente X y $\sum_i A_i$ es la suma de todas las áreas. Este término es independiente del volumen de inyección de muestra y debe cumplirse que todos los picos estén separados. Si se pretende calcular el % en peso de cada componente en vez de la concentración relativa, se debe emplear el método de normalización de áreas con factor de respuesta, con objeto de calcular los factores de corrección debida a la diferente sensibilidad de cada compuesto bajo el detector.

4.1.4. Tiempos de retención patrones

El tiempo de retención característico de cada compuesto ha sido determinado mediante comparación por patrones. En la tabla 6 se encuentran recogidos los tiempos de retención de cada uno de los compuestos analizados:

Nombre compuesto	Tiempo de retención (min)
Tolueno	3.21
Alpha-pineno	6.65
Cineol (Eucaliptol)	8.82
Alpha-terpineno	8.89
P-cymeno	9.07
Limoneno	9.22
Cineol (Eucaliptol)	9.28
Gamma-terpineno	10.10
Terpinoleno	10.90
Terpinen-4-ol	13.64
Alpha-terpineol	13.93
Aromadendreno	20.67

Tabla 6. Tiempo de retención patrones Aceites Esenciales

El siguiente cromatograma pertenece a la disolución de referencia preparada a partir de cada uno de los patrones según la Farmacopea Europea:

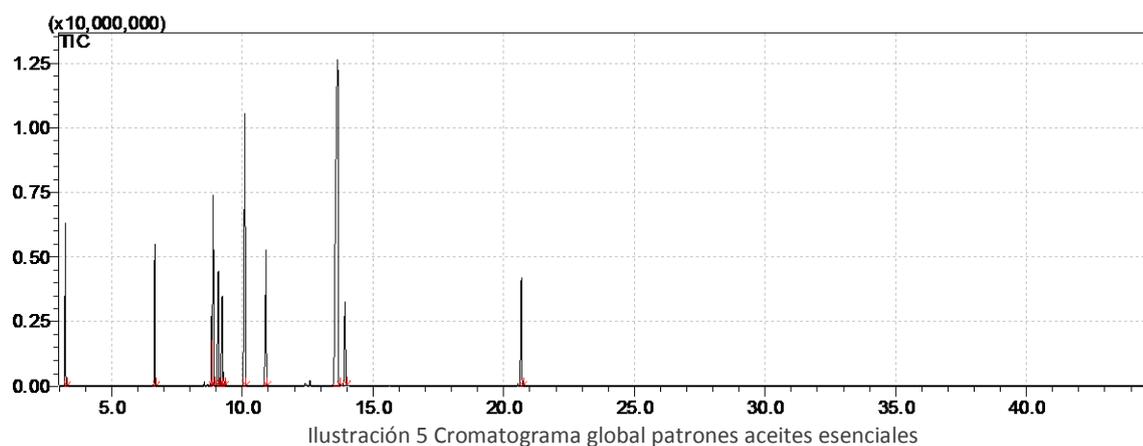
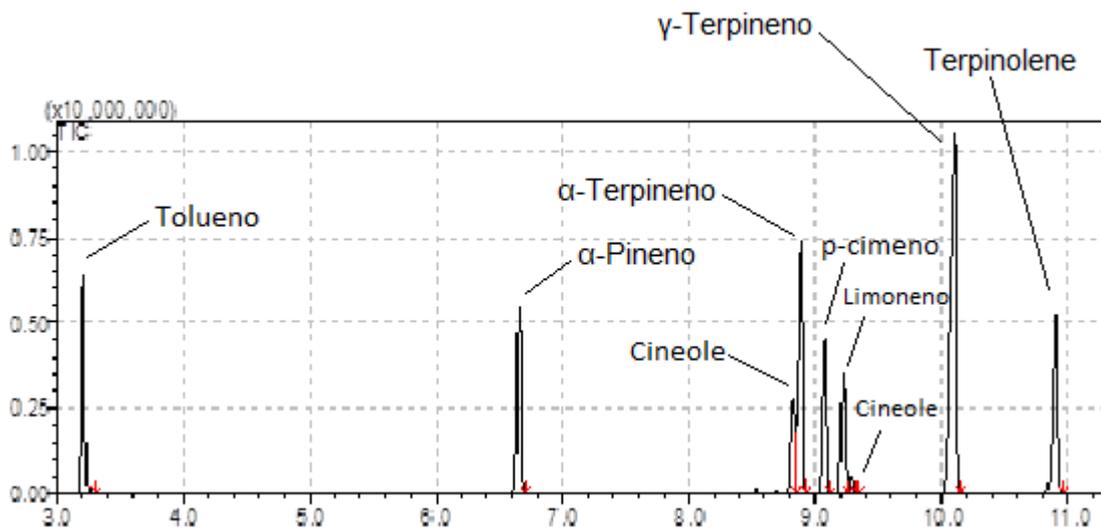
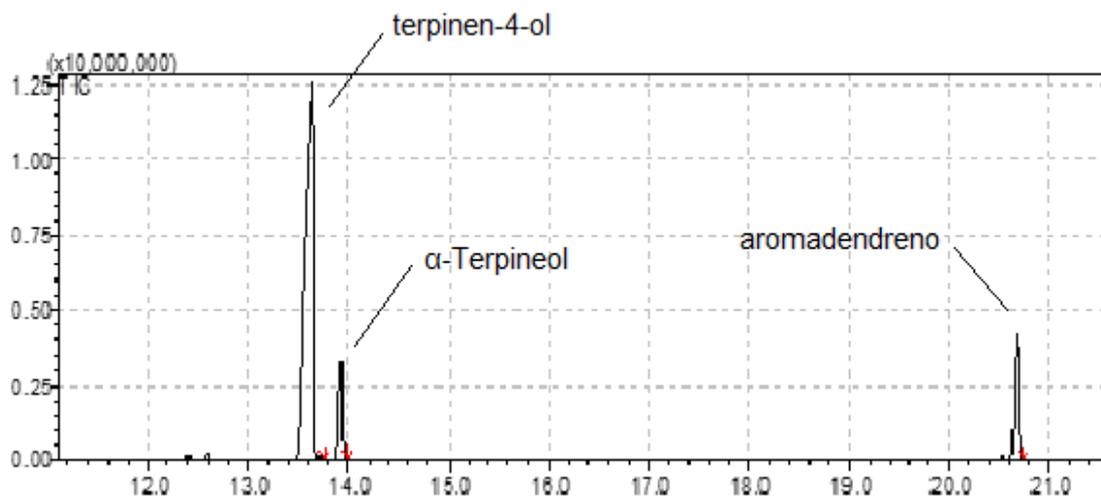


Ilustración 5 Cromatograma global patrones aceites esenciales

Ampliació en dos seccions:



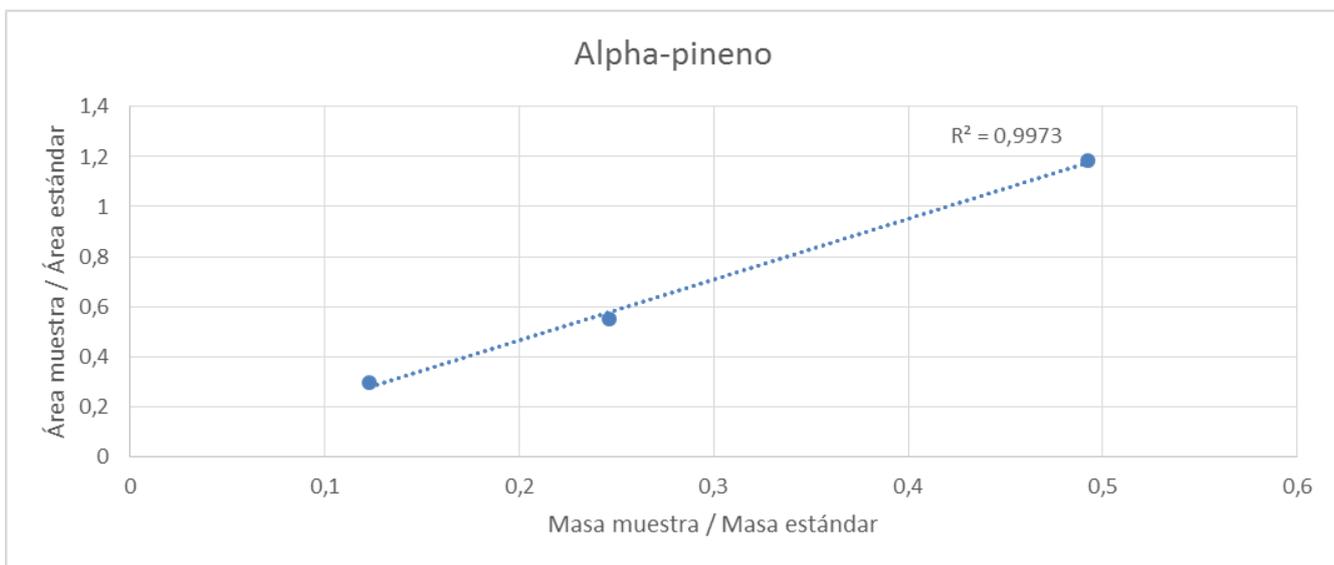
Il·lustració 6. Primera secció cromatograma aceites esenciales



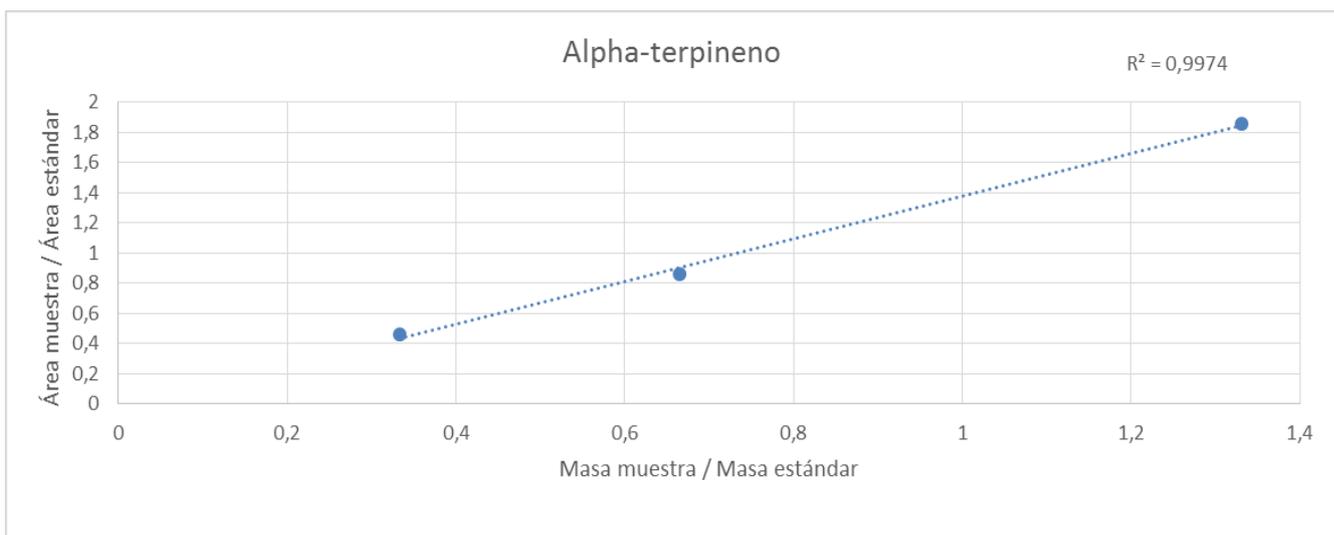
Il·lustració 7. Segona secció cromatograma aceites esenciales

4.1.5. Rectas calibración patrones

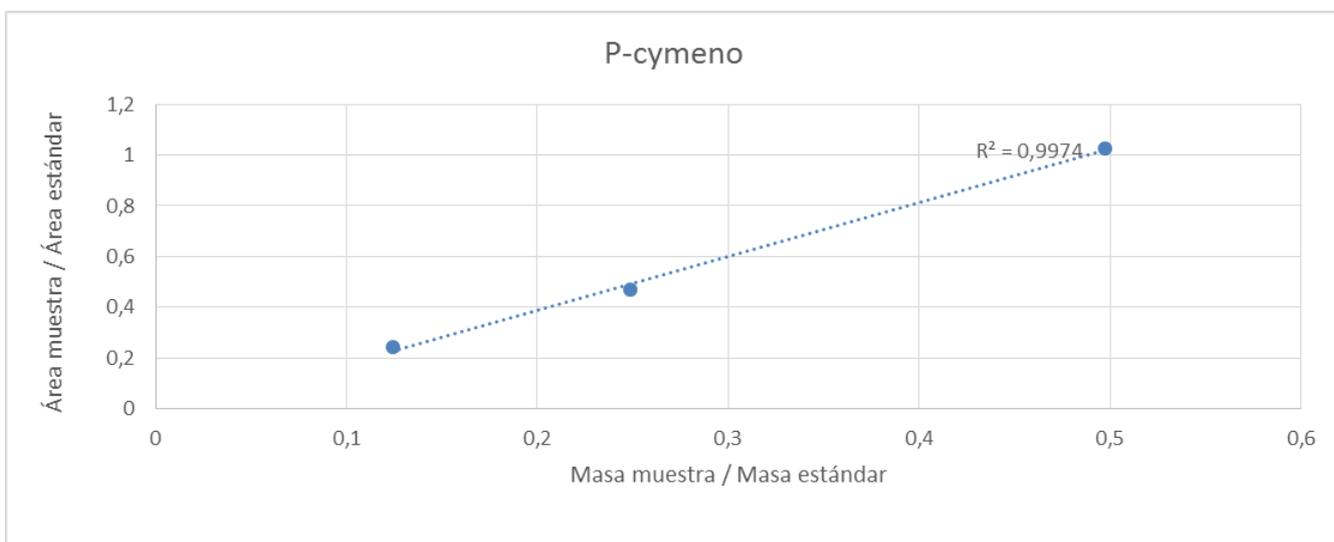
Las rectas de calibración de tres puntos necesarias para la cuantificación absoluta de los compuestos se adjuntan a continuación:



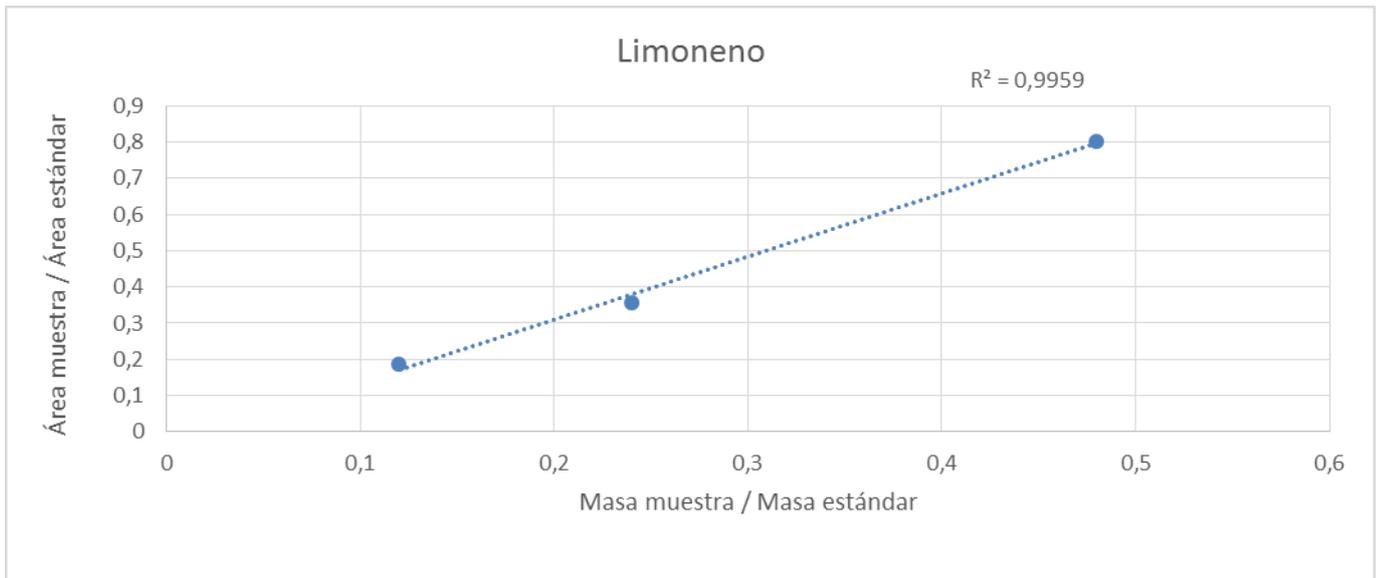
Gràfica 4 Recta de calibració Alpha-pineno



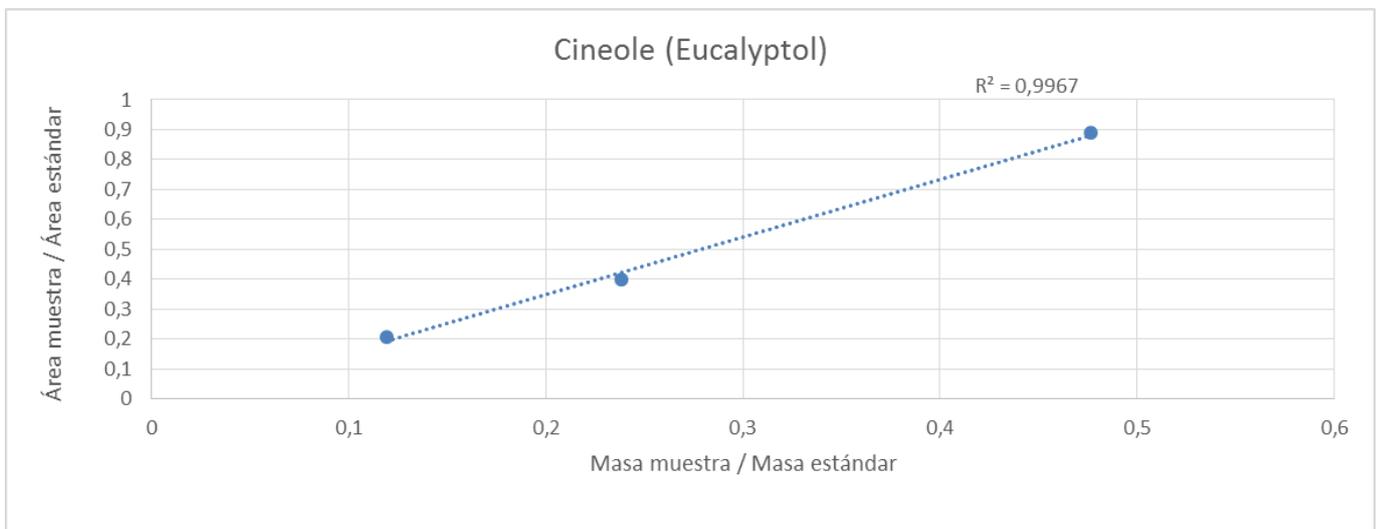
Gràfica 5 Recta de calibració Alpha-terpineno



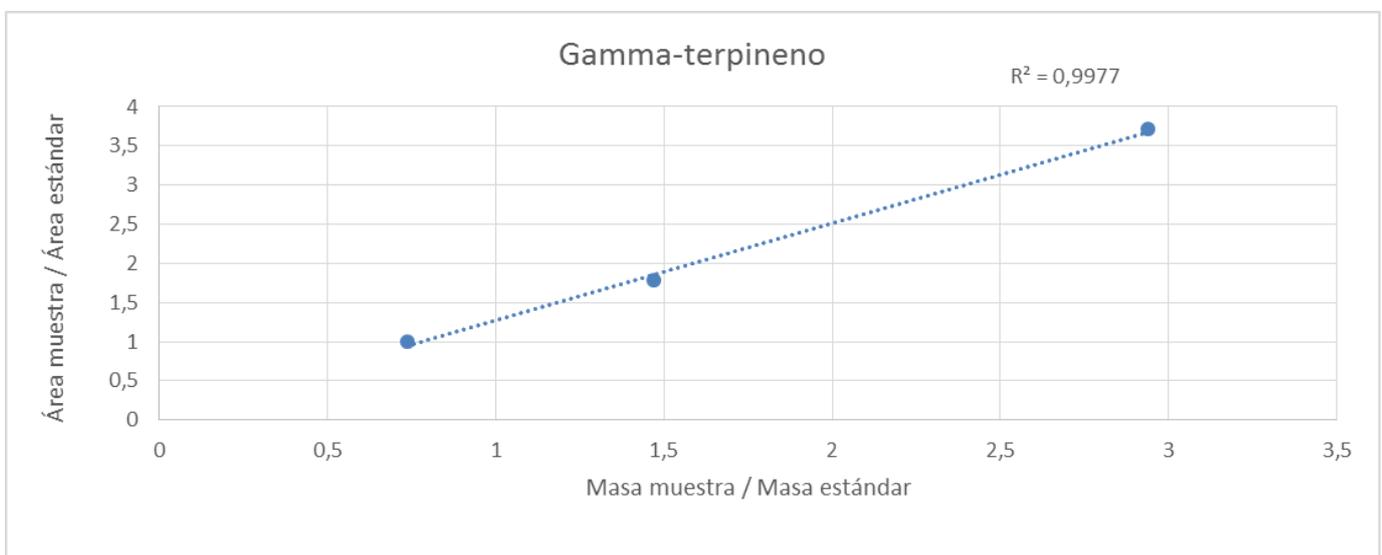
Gràfica 6 Recta de calibració P-cymeno



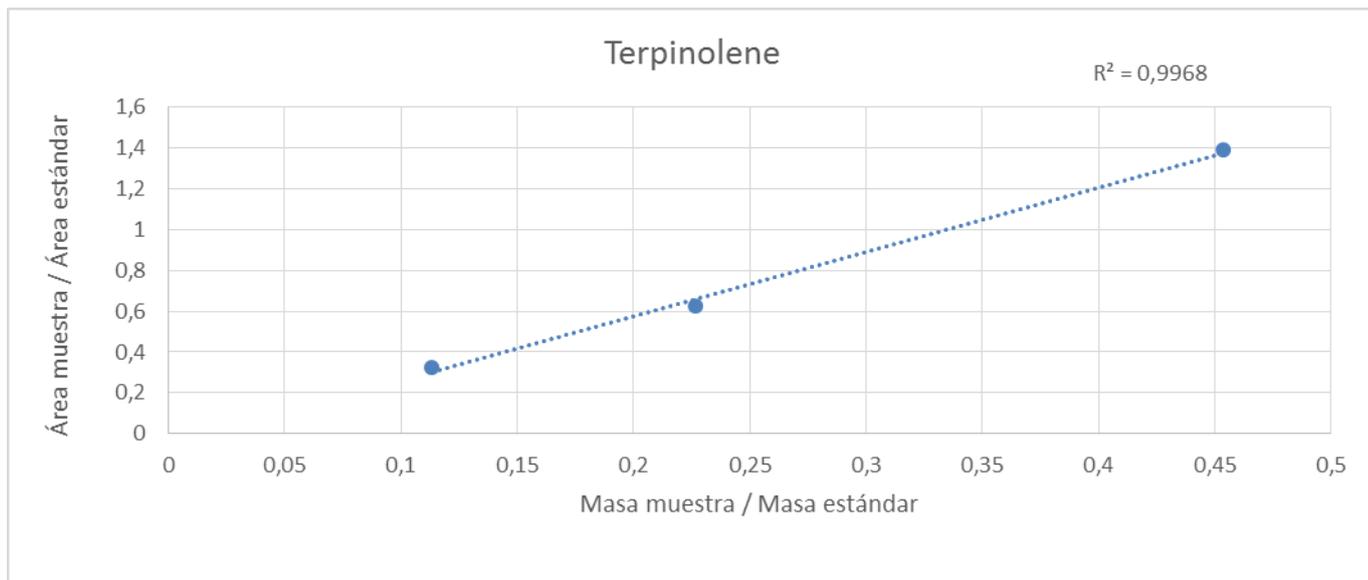
Gráfica 7 Recta de calibración Limoneno



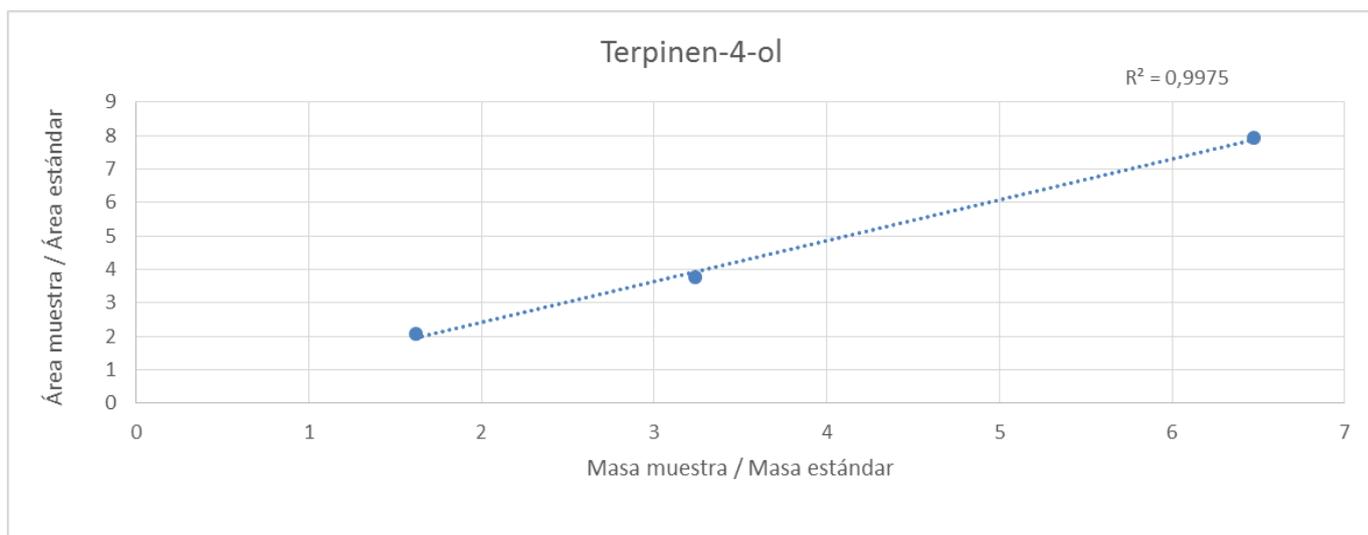
Gráfica 8 Recta de calibración Cineole



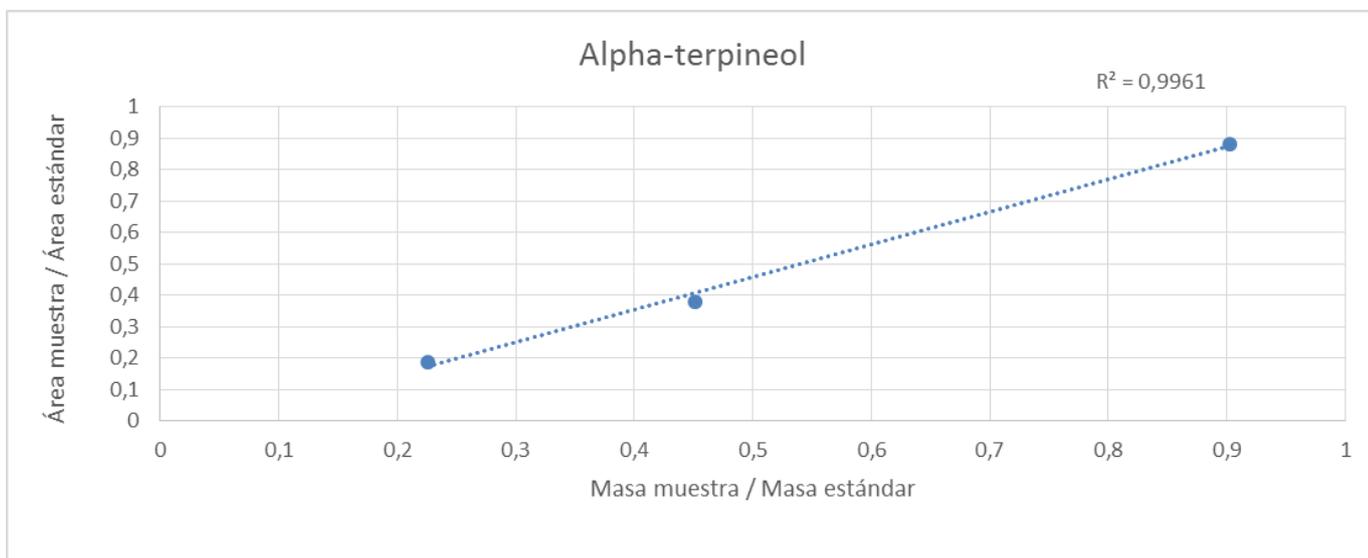
Gráfica 9 Recta de calibración Gamma-terpineno



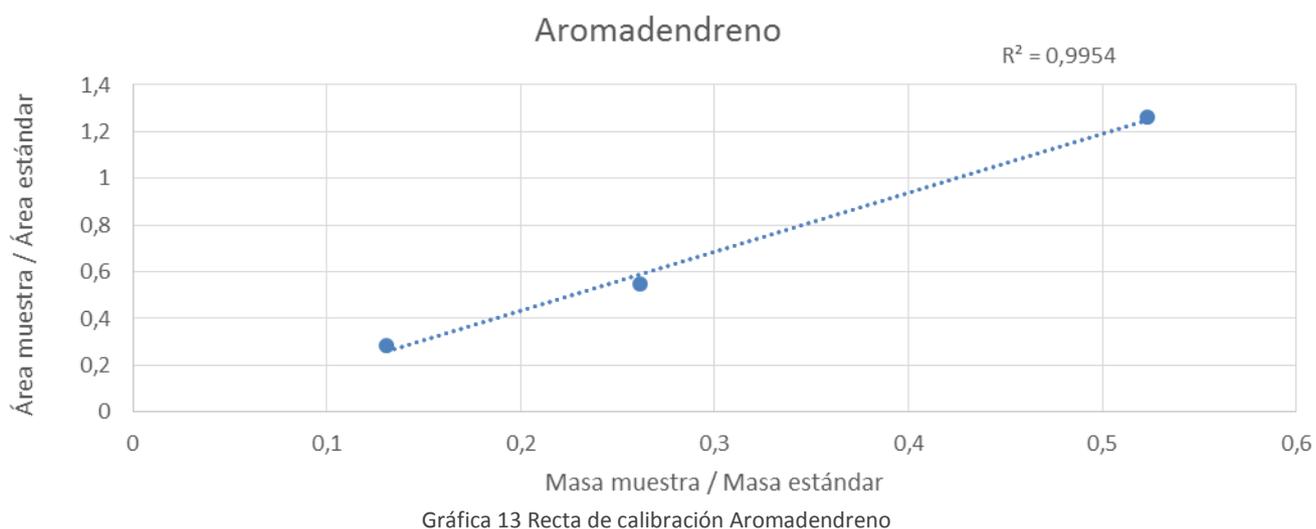
Gràfica 10 Recta de calibració Terpinolene



Gràfica 11 Recta de calibració Terpinen-4-ol



Gràfica 12 Recta de calibració Alpha-terpineol



4.1.6. Análisis muestras

Los tiempos de retención propios de cada compuesto que han permitido su identificación mediante comparación con el patrón correspondiente son:

Nombre compuesto	Tiempo de retención (s)
Alpha-pineno	6.58
Sabineno	7.59
Alpha-terpineno	8.82
P-cymeno	9.00
Limoneno	9.15
Cineole (Eucalyptol)	9.22
Gamma-terpineno	10.05
Terpinolene	10.83
Terpinen-4-ol	13.61
Alpha-terpineol	13.87
Aromadendreno	20.57
Aromadendreno	21.11

Tabla 7 Tiempos de retención muestras Árbol del té

A diferencia de lo que ocurre en el caso de los patrones (ver tabla 6), podemos observar que el aromadendreno en este caso se encuentra por duplicado debido a que se encuentran dos isómeros. Y el Cineole (Eucalyptol) se encuentra en un único pico, a diferencia del patrón, en el que lo podíamos identificar como dos isómeros con tiempos de retención distintos.

Estos dos casos se pueden explicar debido a la posible diferencia entre los patrones de referencia adquiridos y los compuestos que se encuentran en la muestra, ya que se puede tratar de isómeros distintos de un mismo compuesto. Todos los picos se han podido identificar de manera adicional mediante espectrometría de masas.

También podemos observar, tanto en la tabla 7 como en el cromatograma siguiente, la presencia del Sabineno, compuesto que no se encuentra entre los patrones ya que no se pudo disponer del mismo a tiempo para los análisis, y que por lo tanto no se ha podido cuantificar de manera absoluta. A pesar de ello el Sabineno ha sido identificado por espectrometría de masas.

El cromatograma obtenido en el análisis de las muestras, dónde se puede identificar todos los componentes, es el siguiente:

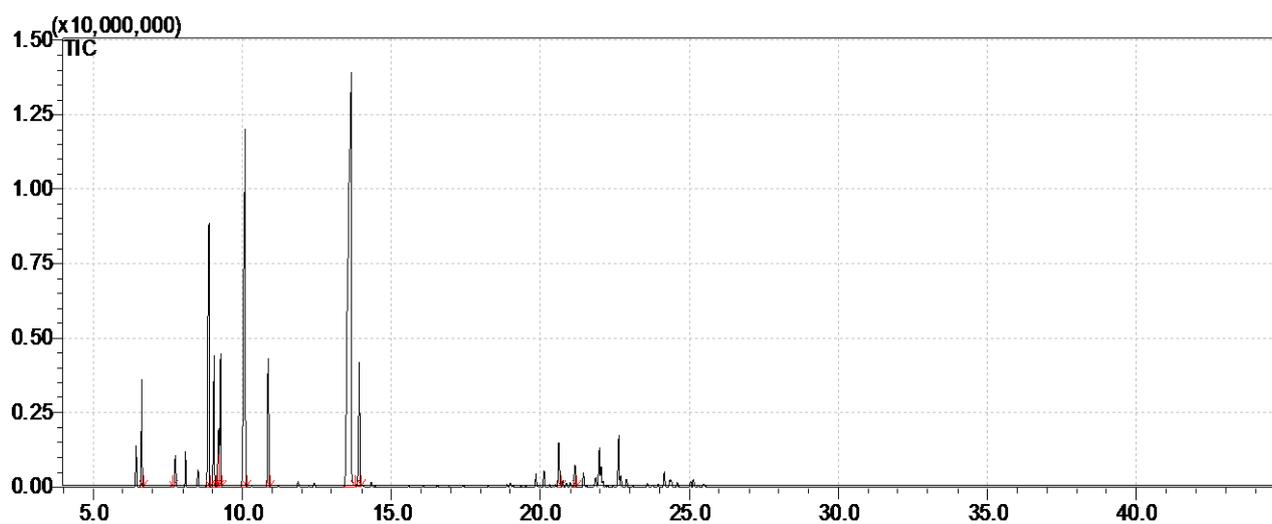
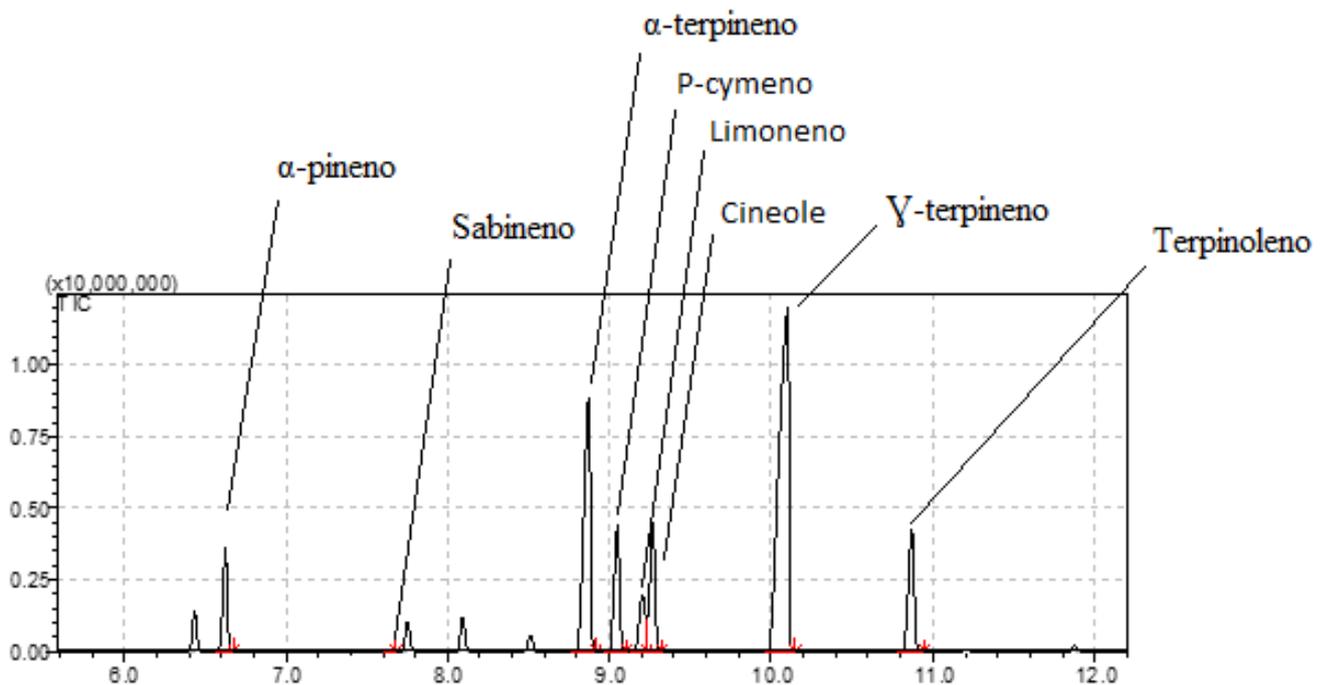
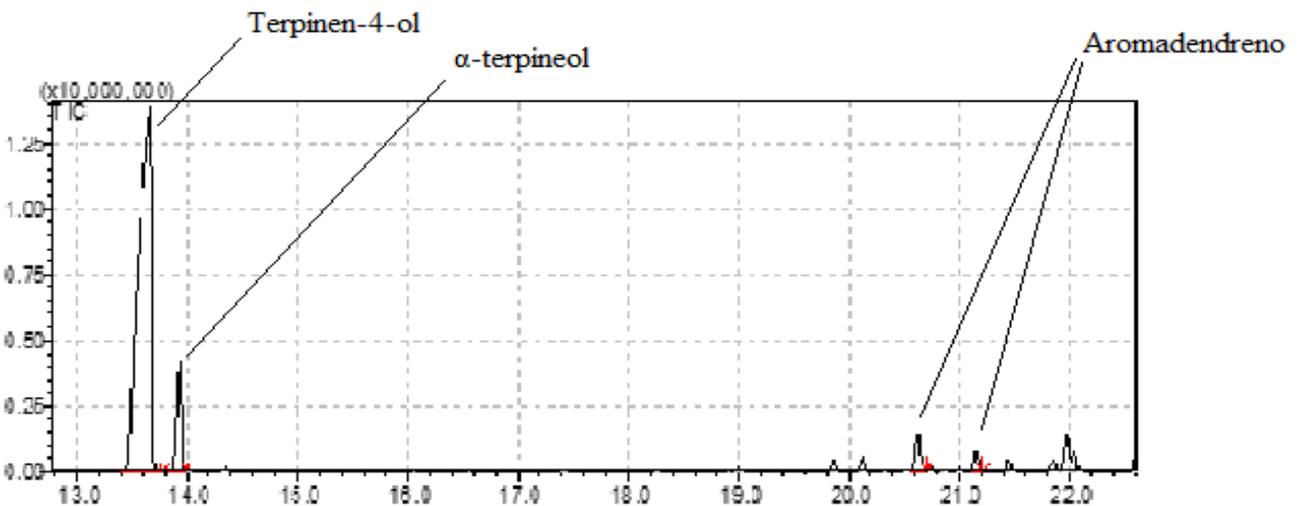


Ilustración 8. Cromatograma global muestras

Ampliació en dos seccions:



Il·lustració 9. Primera secció cromatograma mostres

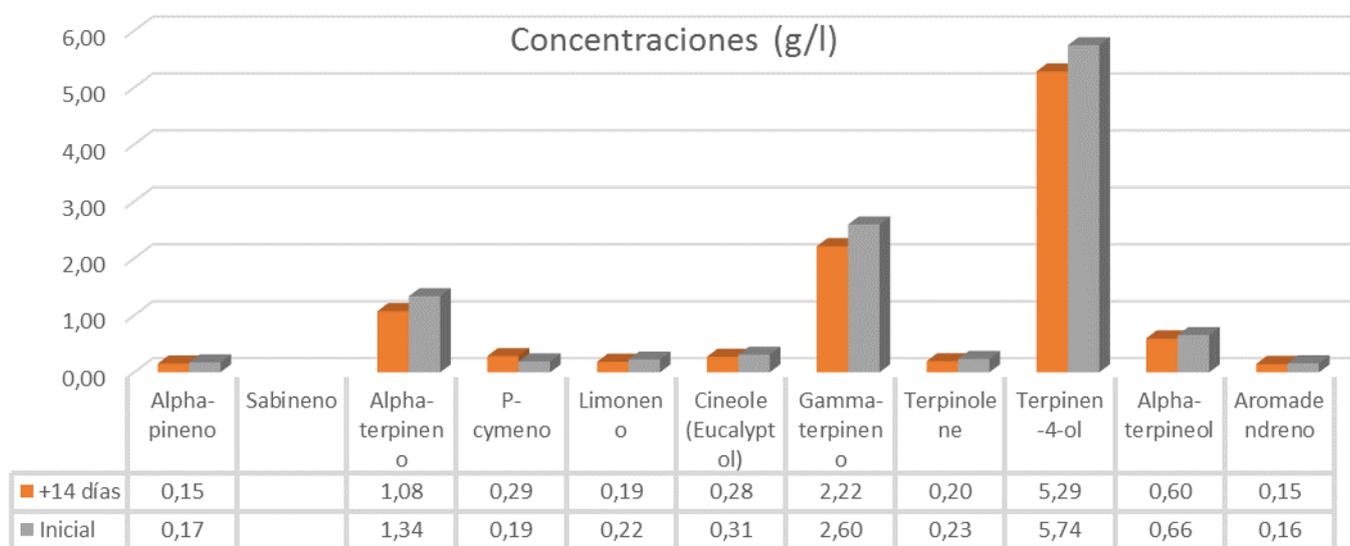


Il·lustració10. Segona secció cromatograma mostres

Los resultados del análisis cuantitativo realizado mediante las rectas de calibrado se adjuntan a continuación. En la tabla 8 se puede observar el resultado del estudio de estabilidad, con los resultados obtenidos en la muestra inicial y en la muestra a t=14 días.

	Concentraciones (g/ml)	
	Muestra inicial	Muestra +14 días
	Intervalo de confianza del 95%	
Alpha-pineno	1,75±0,02	1,55±0,01
Sabineno	-	-
Alpha-terpineno	13,37±0,07	10,75±0,05
P-cymeno	1,92±0,03	2,87±0,01
Limoneno	2,24±0,01	1,87±0,01
Cineole (Eucalyptol)	3,09±0,02	2,75±0,01
Gamma-terpineno	25,9±0,1	22,2±0,2
Terpinolene	2,34±0,01	1,97±0,01
Terpinen-4-ol	57,4±0,3	53±1
Alpha-terpineol	6,55±0,05	6±0,1
Aromadendreno	1,58±0,02	1,48±0,03

Tabla 8 Resultados estudio estabilidad



Gráfica 14 Estudio estabilidad 14 días

Se utilizó el método de la normalización de áreas para determinar el porcentaje en que se encuentran los componentes de la muestra. En este resultado (ver tabla 8) se ha excluido del porcentaje los compuestos presentes en la muestra que no eran de interés para el análisis.

% en que se encuentran los componentes

	Muestra inicial	Muestra +14 días
	Intervalo de confianza del 95%	Intervalo de confianza del 95%
Alpha-pineno	2,56±0,03	2,55±0,05
Sabineno	0,848±0,007	0,813±0,006
Alpha-terpineno	11,77±0,05	10,61±0,08
P-cymeno	2,35±0,02	4,14±0,05
Limoneno	2,30±0,02	2,09±0,02
Cineole (Eucalyptol)	3,56±0,02	3,56±0,03
Gamma-terpineno	20,76±0,05	19,9±0,1
Terpinolene	4,41±0,02	4,12±0,03
Terpinen-4-ol	45,1±0,2	45,9±0,3
Alpha-terpineol	4,07±0,02	4,06±0,02
Aromadendreno	2,21±0,02	1,568±0,008

Tabla 9 Porcentaje de los compuestos estudio estabilidad 14 días

Al comparar ambas muestras se puede observar una disminución en la concentración de todos los componentes, excepto el caso del p-cymeno. En el caso del p-cymeno se produce un aumento en la concentración del mismo muy significativa, en torno a un 50%. Esto puede deberse a que el propio p-cymeno es un producto intermedio que se forma durante la degradación de algunos de los otros compuestos. La gran estabilidad de su estructura aromática hace que compuestos con estructuras muy similares como el γ -terpineno, el α -terpineno, el limoneno o el terpinoleno puedan dar lugar al p-cymeno. No obstante, a pesar del incremento, el p-cymeno sigue estando dentro del rango de porcentajes establecidos.

La Farmacopea Europea establece que el rango de porcentajes para cada compuesto debe ser:

- α -pineno: desde 1.0% hasta 6.0%,
- Sabineno: máximo 3.5%,



- α -terpineno: desde 5.0% hasta 13.0%,
- Limoneno: desde 0.5% hasta 4.0%,
- Cineole: máximo 15.0%,
- γ -terpineno: desde 10% hasta 28%,
- P-cymeno: desde 0.5% hasta 12%,
- Terpinolene: desde 1.5% hasta 5.0%,
- Terpinen-4-ol: mínimo 30.0%,
- Aromadendreno:: máximo 7%,
- α -terpineol: desde 1.5% hasta 8.0%.

Los compuestos se encuentran en el rango de valores en tanto por cien especificado en la Farmacopea Europea.

4.2. Análisis del producto Hipérico

Para realizar el análisis de este producto se han seguido las directrices de la Farmacopea Europea, la cual indica cómo debe realizarse la extracción del compuesto y la longitud de onda a la cual se debe realizar la medida de absorbancia mediante espectrofotómetro.

4.2.1. Extracción de la hipericina

La muestra a analizar es polvo de sumidades floridas de *Hypericum perforatum* y se encuentra en estado sólido, por lo que es necesario llevar a cabo un proceso de extracción del principio activo a fase líquida, ya que el análisis de este compuesto se realizará mediante medida espectrofotométrica.



Ilustración 11. Material empleado en la extracción

Para llevar a cabo la extracción sólido-líquido, se ha pesado una cantidad de muestra próxima a 0.8 g y se ha introducido en un matraz de fondo redondo de 250 ml.



Ilustración 12. Muestra en matraz de fondo redondo de 250 ml

A continuación se han añadido 60 ml de una mezcla tetrahidrofurano/agua 80:20, y se ha llevado a ebullición con reflujo dentro de un baño maría programado a 70°C durante 30 minutos.



Ilustración 13. Ebullición con reflujo



Ilustración 14. Baño termostático a 70°C

Transcurridos los 30 minutos, recuperamos el líquido contenido en el matraz de fondo redondo y lo pasamos a tubos de centrifuga. Centrifugamos a 4000 rpm durante cinco

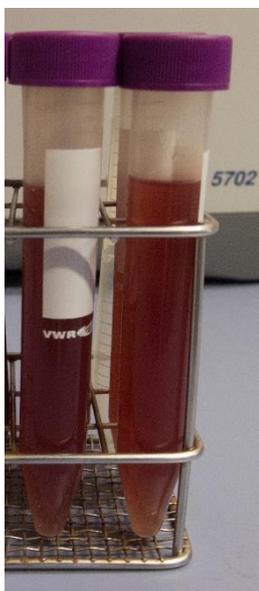


Ilustración 15. Extracto antes del centrifugado

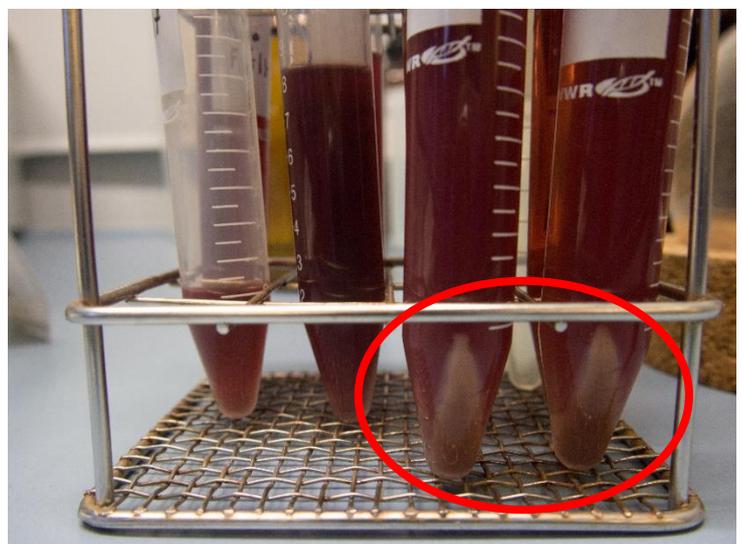


Ilustración 16. Extracto después del centrifugado

minutos para que se depositen en el fondo todas las partículas en suspensión y vertemos el sobrenadante en un vaso de precipitados de 250 ml, dónde iremos reuniendo los extractos realizados en todas las etapas.

A continuación recuperamos los sólidos que hayan quedado en los tubos de centrifuga y los introducimos en el matraz de fondo redondo de nuevo utilizando aproximadamente 60 ml de la misma fase de extracción (tetrahidrofurano/agua 80:20), cuidadosamente y evitando en la medida posible que quede ningún resto en los tubos. Llevamos de nuevo la disolución a ebullición con reflujo durante otros 30 minutos.

Repetimos el procedimiento, tomamos el líquido, centrifugamos durante 5 minutos a 4000 rpm y vertemos el sobrenadante en el vaso de precipitados que contiene el extracto anterior.



Ilustración 17. Extractos reunidos en vaso de precipitados

Con esta segunda extracción aseguramos una recuperación de la hipericina del 100%, pudiendo observar una disminución en la coloración del segundo extracto.

A continuación, tomamos el vaso que reúne los extractos y lo evaporamos hasta la sequedad, para agilizar el procedimiento lo introducimos en el baño maría a 50°C. Una vez se ha evaporado todo el líquido, recuperamos los sólidos con 15 ml de metanol y con la ayuda de un baño de ultrasonidos lo transferimos a un matraz aforado de 25 ml. Acabamos de limpiar con metanol el vaso de precipitados hasta enrasar el matraz de 25 ml, intentando siempre minimizar las posibles pérdidas.



Ilustración 18. Aspecto extracto evaporado hasta sequedad



Ilustración 19. Recuperación extracto seco mediante ultrasonidos y metanol

Seguidamente, centrifugamos por última vez, tomamos el sobrenadante con una jeringuilla de 10 ml, y filtramos a través de dos filtros de disco montados en serie, el primero con una membrana de Nylon de $0.45\ \mu\text{m}$, y el segundo con una membrana de PTFE de $0.25\ \mu\text{m}$. Rechazamos los dos primeros ml de filtrado, introducimos 5ml de filtrado en un matraz aforado de 25 ml y enrasamos con metanol.

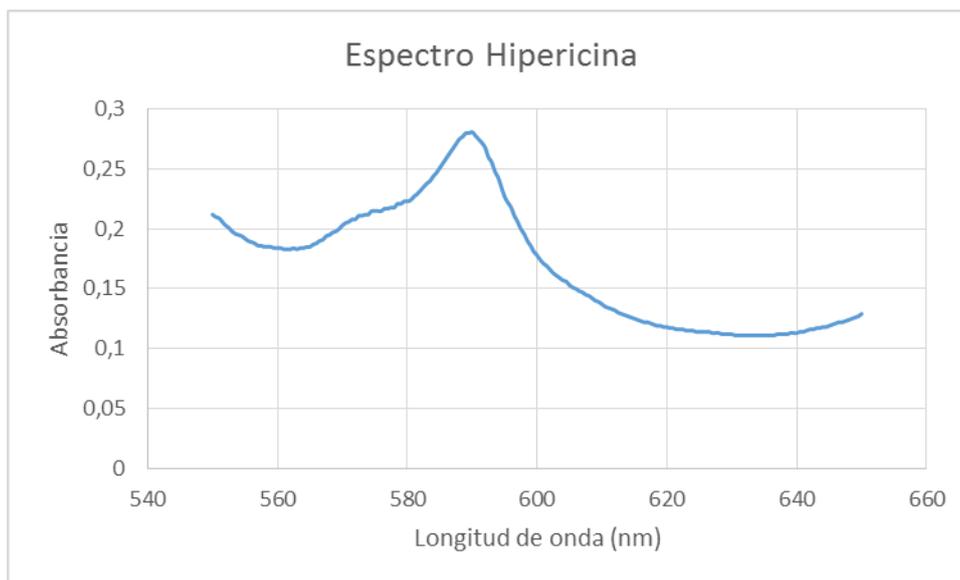
4.2.2. Cálculo del % humedad

Según indica la Farmacopea Europea, siempre se ha de tener en cuenta el contenido en humedad de la muestras a analizar, por lo que se ha determinado la humedad de la muestra original según el procedimiento indicado por la misma. Es decir, se ha pesado 1 g de la muestra en polvo, se ha tenido en estufa a 105°C durante 2h, y se ha medido su pérdida por desecación.

Tras analizar la pérdida de masa gravimétricamente, se ha determinado que la muestra contiene un 4% de humedad.

4.2.3. Análisis de la hipericina

El análisis ha sido llevado a cabo por medida de la absorbancia mediante el espectrofotómetro especificado en el apartado 3.1. *Midiendo a $590\ \text{nm}$ –máxima absorbancia del compuesto analizado- y realizando el blanco con metanol.*



Gráfica 15 Espectro absorción de la Hipericina

Se ha calculado el contenido en hipericinas totales del extracto seco de Polvo de sumidades floridas de *Hypericum perforatum* (L) en tanto por ciento mediante la expresión:

$$\text{Hipericinas totales}_{(\%)} = \frac{A \times 125}{m \times 870}$$

Dónde:

A es la absorbancia a 590nm

m es la masa de muestra

125 es el factor de dilución

870 es el valor de la absorbancia específica

El contenido en tanto por cien en hipericinas totales obtenido, expresado como hipericina, es el siguiente:

% en hipericinas totales = 0,096±0,001%

4.3. Análisis de un producto solar

En el desarrollo del método de análisis de este producto no se dispone de Farmacopea Europea, por lo que para definir el método de extracción y análisis ha sido necesario consultar bibliografías y probar con distintos métodos.

4.3.1. Extracción

La muestra a analizar consiste en una mezcla de diferentes extractos y compuestos entre los cuales se espera encontrar β -Caroteno y α -Tocoferol. Se encuentra en estado sólido, por lo que es necesario realizar una extracción sólido-líquido, para su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Dadas las diferencias de solubilidad de estos dos principios activos, su extracción se realizará por separado y con métodos distintos.

4.3.2. Extracción β -Caroteno

En este caso se ha llevado a cabo una extracción sólido-líquido en cuatro etapas, y en todas ellas la muestra se ha introducido en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos – el cual se mantiene refrigerado para evitar la degradación del compuesto debido a la temperatura alcanzada por el baño-.

En las dos primeras etapas se ha empleado metanol como fase de extracción debido a que ha resultado ser el disolvente más apropiado para disolver las partículas de β -Caroteno, que en principio no se encuentran accesibles. Al realizar estas dos primeras etapas podemos apreciar cómo las partículas ricas en β -Caroteno quedan expuestas, mostrando el color característico del compuesto.

Tras cada extracción se centrifuga la muestra y se vierte el sobrenadante en un matraz aforado de 25ml donde se van reuniendo todos los extractos, y para evitar pérdidas por evaporación así como por degradación por acción de la temperatura o interacción con la luz, ya que el β -Caroteno es especialmente sensible a estos factores, el matraz se guarda en nevera entre extracción y extracción. Las dos últimas etapas se realizan con éter etílico, en el cual el β -Caroteno es muy soluble. Con la última etapa se aprecia una disminución notable en la coloración del extracto, lo que nos indica que se ha extraído prácticamente todo el β -Caroteno.

4.3.3. Extracció α -Tocoferol

En este caso también se ha realizado una extracción sólido-líquido en cuatro etapas, introduciendo la muestra en un baño de ultrasonidos con refrigeración durante 10 minutos en cada una de las etapas. En este caso la fase de extracción empleada en todas las etapas ha sido una mezcla metanol/acetonitrilo (50:50). Tras cada extracción se centrifuga la muestra y se vierte el sobrenadante en un matraz aforado de 25 ml dónde se van reuniendo todos los extractos, reservando dicho matraz en la nevera entre las sucesivas extracción con el fin de evitar pérdidas por evaporación o degradación por acción de la temperatura o interacción con la luz.

4.3.4. Cálculo del % humedad

Según indica la Farmacopea Europea, siempre se ha de tener en cuenta el contenido en humedad de la muestras a analizar, por lo que se ha determinado la humedad de la muestra original según el procedimiento indicado por la misma. Es decir, se ha pesado 1,0 g de la muestra en polvo, se ha tenido en estufa a 105°C durante 2 h, y se ha medido su pérdida por desecación.

Tras analizar la pérdida de masa gravimétricamente, se ha determinado que la muestra contiene un 6% de humedad.

4.3.5. Preparación de patrones

Para preparar el patrón de α -Tocoferol se ha pesado una cantidad de 49mg del patrón α -Tocoferol al 98'6% y se ha disuelto en 50ml de una mezcla metanol/acetonitrilo (50:50). A partir de este patrón inicial, se han llevado a cabo dos diluciones, obteniendo de este modo los otros dos puntos de la recta de calibrado.

El patrón de β -Caroteno se ha preparado pesando 3.5mg de β -Caroteno al 94'9% y disolviendo en 50ml de éter etílico. A partir de este patrón inicial, por dilución se han obtenido los otros dos puntos de la recta de calibrado.

4.3.6. Análisis de β -Caroteno y α -Tocoferol

El análisis de ambos compuestos se ha realizado mediante el mismo sistema cromatográfico, empleando el equipo descrito en el apartado 3.1. . Como fase estacionaria

se ha utilizado una columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (5 μm). La fase móvil utilizada ha sido metanol con un flujo de 1.4 ml/min. En todos los análisis se ha inyectado un volumen de 60 μl , siempre previo filtrado con membranas de Nylon de 0.45 μm (Millipore Millex-HN). La detección se realizó a una longitud de onda de 285 nm para el α -Tocoferol y 448 nm para el β -Caroteno, picos de máxima absorbanza de los compuestos.

A continuación se adjuntan los espectros de absorbanza de cada uno de ellos:

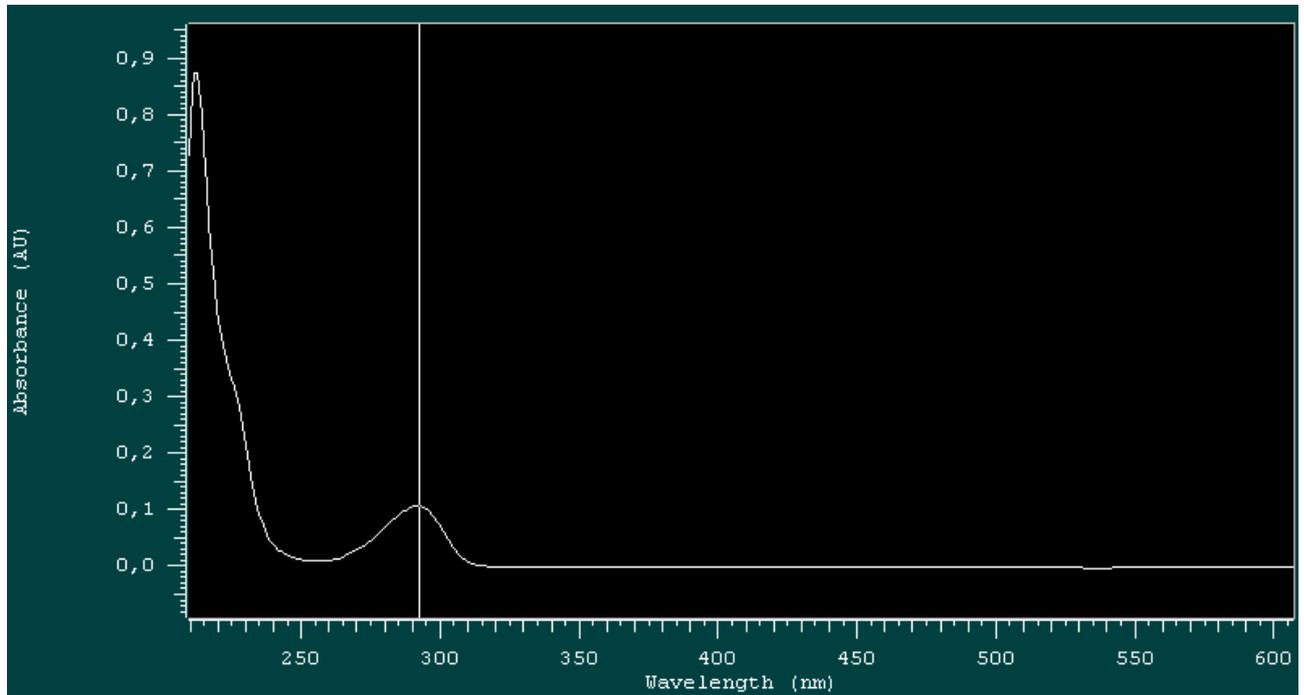


Ilustración 20 Espectro absorción Alpha-tocoferol

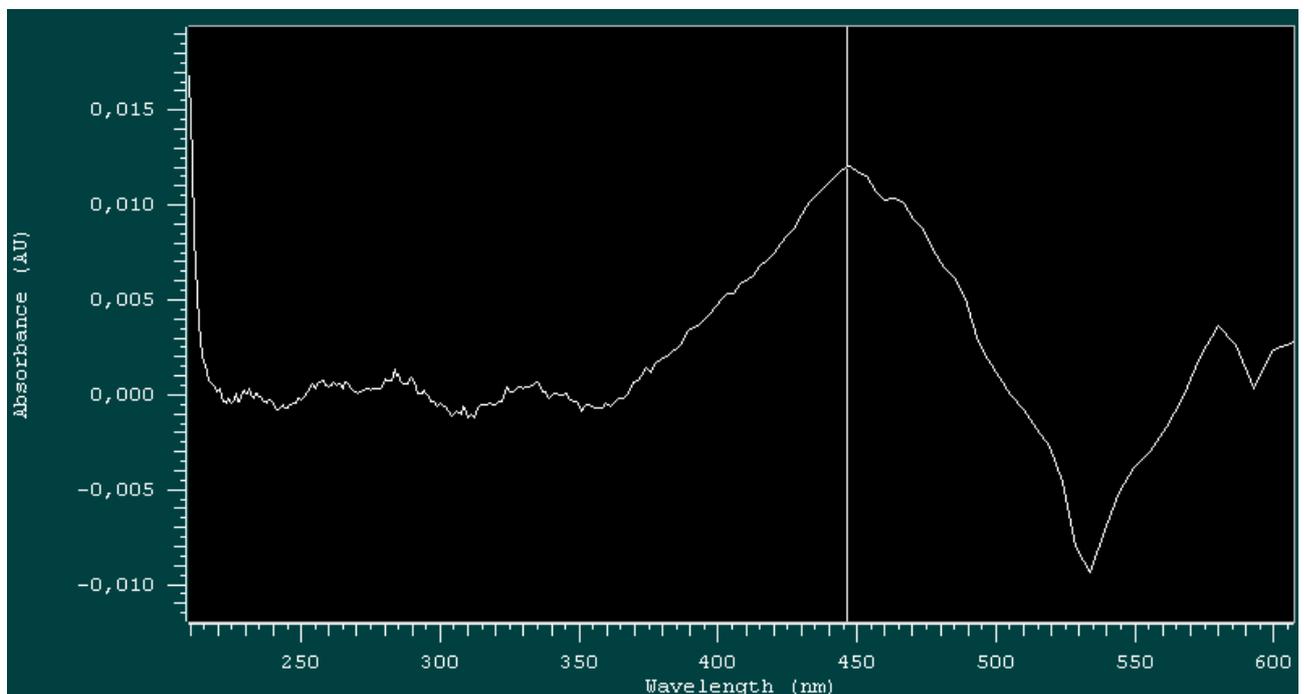


Ilustración 21 Espectro absorción Beta-caroteno

La identificación de ambos productos ha sido posible gracias al tiempo de retención propio de cada uno de ellos por comparación con su patrón correspondiente. Se ha determinado el contenido en ambos compuestos por cada 100 g del polvo de la muestra mediante rectas las rectas de calibrado de tres puntos realizadas a partir de cada patrón.

Los tiempos de retención se encuentran recogidos en la tabla 10:

	Tiempo de retención (min)
α -Tocoferol	6,4
β -Caroteno	33,0

Tabla 10 Tiempo de retención patrones

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a los patrones:

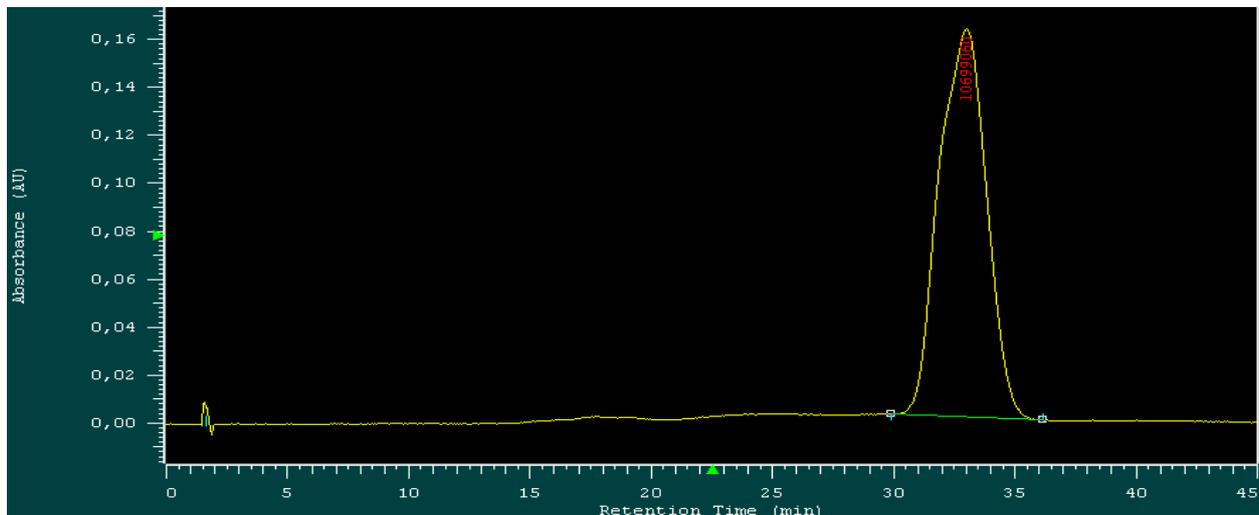


Ilustración 22. Cromatograma patrón β -Caroteno [448nm]

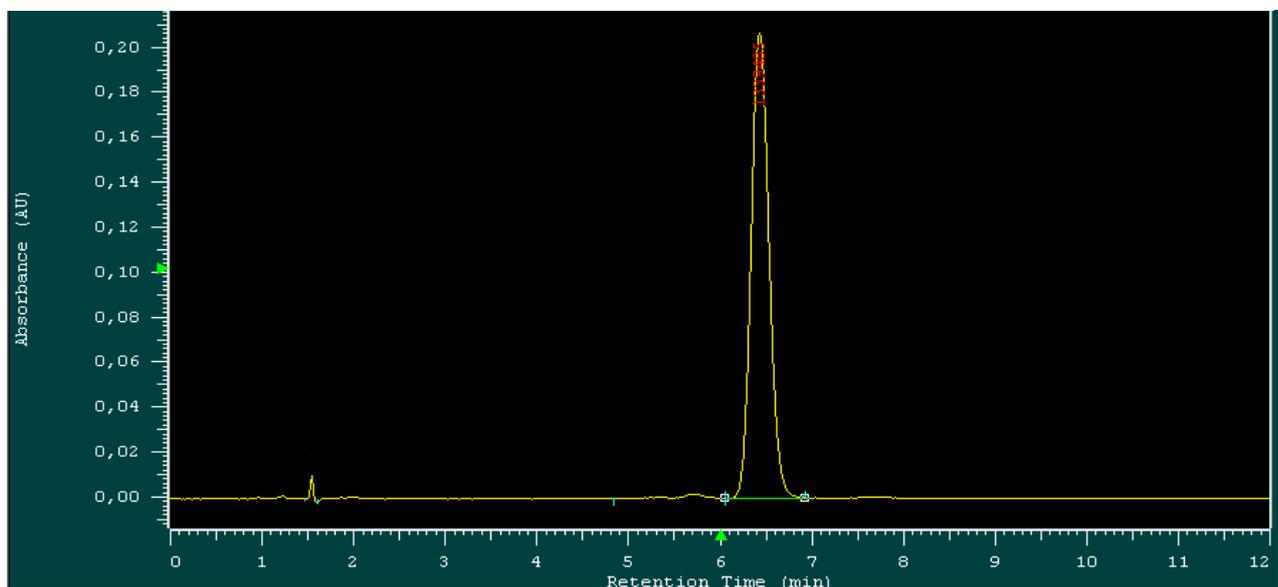
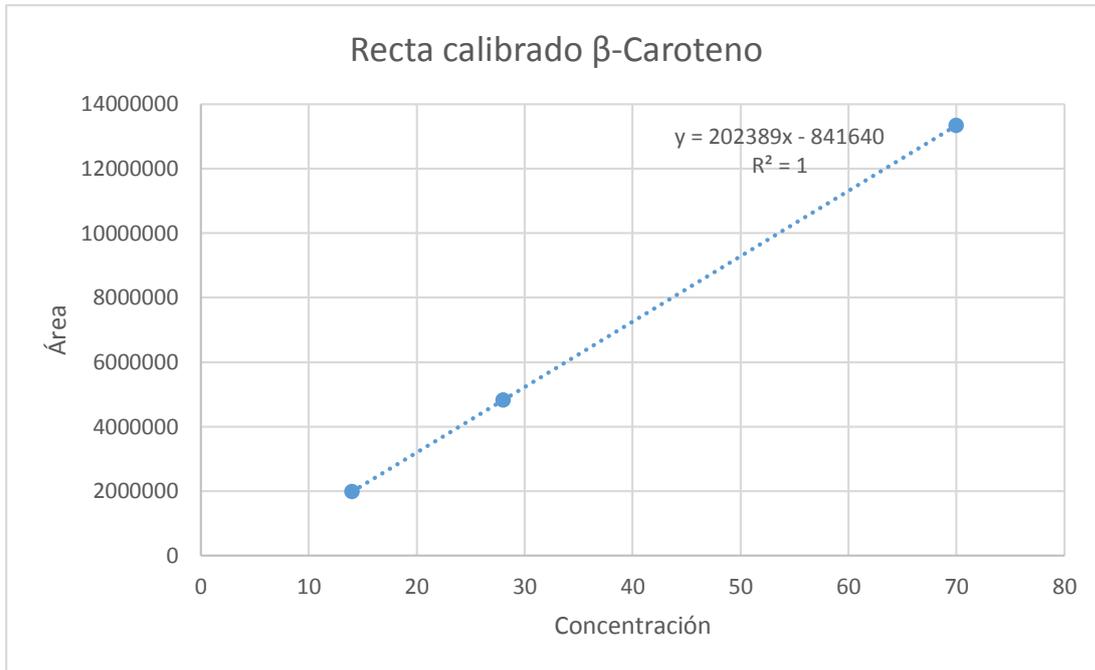


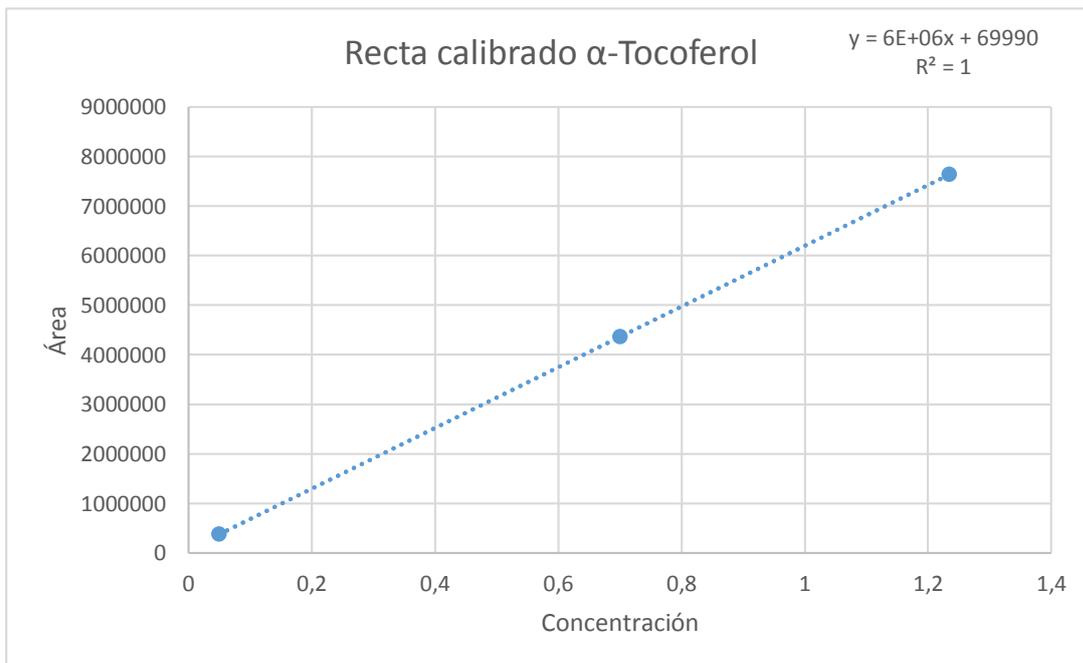
Ilustración 23. Cromatograma patrón α -Tocoferol [285nm]

4.3.7. Rectas calibrado patrones β -Caroteno y α -Tocoferol

Las rectas de calibrado de tres puntos empleadas en la cuantificación de ambos compuestos se adjuntan a continuación:



Gráfica 15 Recta de calibración Beta-caroteno



Gráfica 16 Recta de calibración Alpha-tocoferol

4.3.8. Resultados análisis β -Caroteno y α -Tocoferol

Se ha determinado el contenido en ambos compuestos por cada 100g del polvo de la muestra mediante rectas de calibrado de tres puntos realizadas a partir de cada patrón. A continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos:

Masa	
Intervalo de confianza del 95%	
α -Tocoferol	801 \pm 40 (mg)
β -Caroteno	958691 \pm 47410 (μ g)

Los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras son los siguientes:

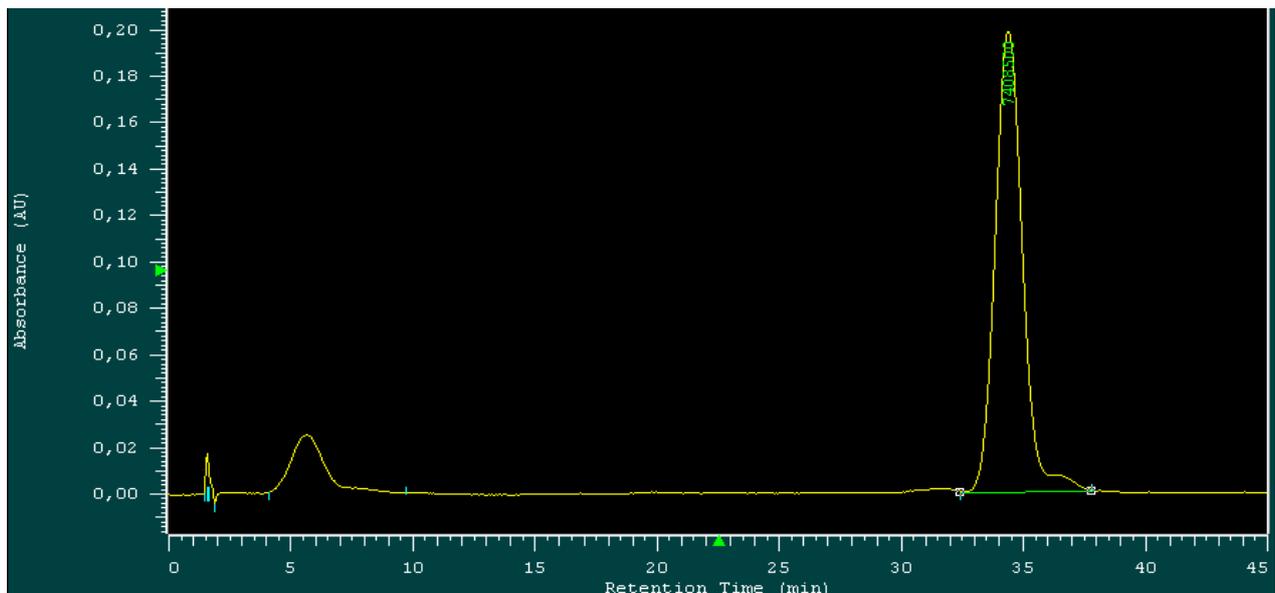


Ilustración 24. Cromatograma análisis α -Tocoferol [285nm]

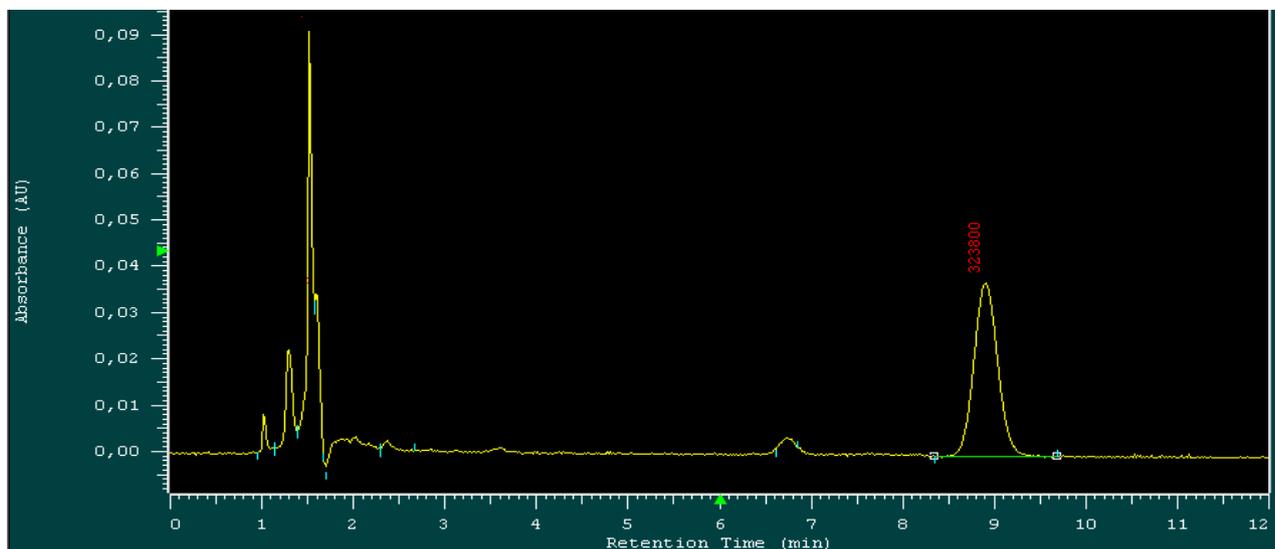


Ilustración 25. Cromatograma análisis β -Caroteno [448nm]

5. Estudio de los costes

Para realizar el estudio de los costes se va a tener en cuenta los equipos empleados en la realización de cada uno de los métodos desarrollados así como los reactivos y productos.

5.1. Costes Árbol del té

Para llevar a cabo el análisis del Árbol del té, es necesario comprar un equipo de cromatografía de gases – espectrometría de masas, con un valor de aproximadamente 50.000€, y con una amortización al 50%, con un coeficiente de uso del equipo del 20% para el análisis del producto. Por tanto el precio imputable sería:

$$\text{Precio imputable} = \frac{50.000}{5} * 0.2 = 2.000\text{€/año}$$

Por otra parte, los materiales consumibles empleados por año en la realización de los análisis son:

Concepto	Cantidad	Precio €/Unidad	Precio
Microjeringa cromatográfica	2	50	100
Alquiler bala Helio	1 año	250	250
Tolueno	1l	107	107
Hexano	2l	108,5	217
Helio	9.1m ³	800	800
α-Pineno	250ml	82,3	82,3
α-Terpineno	100ml	43,8	43,8
α-Terpineol	5ml	218	218
Aromadendreno	1ml	65,3	65,3
Cineol	50ml	23,7	23,7
γ-Terpineno	100ml	38,4	38,4
Limoneno	250g	70,3	70,3
P-cimeno	25ml	34,4	34,4
Terpinen-4-ol	25g	61,2	61,2
Terpinoleno	500ml	61	61
TOTAL			1.643,5

Los costes de producción anuales se detallan a continuación, y para su cálculo se ha supuesto que ya disponemos de un laboratorio funcional, por lo que los gastos de luz y agua no han sido tenidos en cuenta.

Concepto	Cantidad	Precio €/Unidad	Precio
Trabajador	1 año	22.000	22000
Columna cromatográfica	2 unidades	1.000	1.000
TOTAL			23.000

Puesto que el trabajador sólo dedicará una parte de su tiempo a la realización de este análisis, y la columna será empleada en otros análisis, a ambos se les va a aplicar un factor de dedicación del 20%.

$$\text{Precio imputable} = 23.000 * 0,2 = 4.600\text{€}$$

La suma total, teniendo en cuenta equipos, consumibles y costes de producción

$$2.000 + 1.643 + 4.600 = 8.243\text{€/año}$$

Bajo el supuesto de que se realizan 500 análisis por año, el precio imputable por análisis sería:

$$\text{Precio imputable por análisis} = \frac{8.243}{500} = 16,48\text{€/análisis}$$

5.2. Costes Hipérico

Para llevar a cabo el análisis de la hipericina es necesario un espectrofotómetro, con un coste aproximado de 5.000€, un baño termostaticado, 1.500€ aprox., una centrífuga, 2.000€ aprox., y una estufa de secado de aproximadamente 2.000€. Si todos los equipos tienen una amortización del 50% y aplicando un coeficiente de uso de los mismos del 15%:

$$\text{Precio imputable} = \frac{(5.000 + 1.500 + 2.000 + 2.000)}{5} * 0.15 = 315\text{€/año}$$

Por otra parte, el coste de los materiales consumibles empleados en la realización de los análisis de hipericina durante un año son los siguientes:

Concepto	Cantidad	Precio €/Unidad	Precio
Tetrahidrofurano	1l	146	146
Metanol	2,5l	50.2	50.2
TOTAL			196.2

Los costes de producción anuales se detallan a continuación, y para su cálculo se ha supuesto que ya disponemos de un laboratorio funcional, por lo que los gastos de luz y agua no han sido tenidos en cuenta.

Concepto	Cantidad	Precio €/Unidad	Precio
Trabajador	1 año	22.000	22000
TOTAL			22.000

Puesto que el trabajador sólo dedicará una parte de su tiempo a la realización de este análisis se le aplica un factor de dedicación del 20%.

$$\text{Precio imputable} = 22.000 * 0,2 = 4.400\text{€}$$

La suma total, teniendo en cuenta equipos, consumibles y costes de producción

$$315 + 196 + 4.400 = 4.911\text{€/año}$$

Bajo el supuesto de que se realizan 500 análisis por año, el precio imputable por análisis sería:

$$\text{Precio imputable por análisis} = \frac{4.911}{500} = 9,82\text{€/análisis}$$

5.3. Costes producto solar

Para llevar a cabo los análisis del β -Caroteno y del α -Tocoferol es necesario un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, 30.000€ aprox. y un baño de ultrasonidos, 2.000€ aprox. Con una amortización al 50% para ambos equipos y un coeficiente de uso del 30%:

$$\text{Precio imputable} = \frac{(30.000 + 2.000)}{5} * 0.3 = 1.920\text{€/año}$$

Por otra parte, el coste de los materiales consumibles empleados en la realización de los análisis del β -Caroteno y del α -Tocoferol durante un año son los siguientes:

Concepto	Cantidad	Precio €/Unidad	Precio
Metanol	25l	16	400
Acetonitrilo	12,5l	12	50
Éter etílico	6l	80	480
β -Caroteno	1g	62.6	62.6
α -Tocoferol	2g	38.9	77.8
TOTAL			930

Los costes de producción anuales se detallan a continuación, y para su cálculo se ha supuesto que ya disponemos de un laboratorio funcional, por lo que los gastos de luz y agua no han sido tenidos en cuenta.

Concepto	Cantidad	Precio €/Unidad	Precio
Trabajador	1 año	22.000	22000
TOTAL			22.000

Puesto que el trabajador sólo dedicará una parte de su tiempo a la realización de este análisis se le aplica un factor de dedicación del 30%.

$$\text{Precio imputable} = 22.000 * 0,3 = 6.600\text{€}$$

La suma total, teniendo en cuenta equipos, consumibles y costes de producción

$$1.920 + 930 + 6.600 = 9.450\text{€/año}$$

Bajo el supuesto de que se realizan 500 análisis por año, el precio imputable por análisis sería:

$$\text{Precio imputable por análisis} = \frac{9.450}{500} = 18.9\text{€/análisis}$$

5.4. Coste total

A continuación se suman los costes calculados en los apartados anteriores para poder estimar el coste que supondría realizarlos durante un período de un año, teniendo en cuenta amortización de equipos, costes en material consumible y costes de producción.

$$\text{Coste anual total} = 8.243 + 4.911 + 9.450 = 22.604\text{€}$$

Lo que se traduce en un coste de 1.883€ al mes para llevar a cabo los tres métodos desarrollados en el proyecto.

6. Tratamiento de los residuos

Todos los residuos generados en la realización de los análisis han sido tratados según el sistema de *Gestión de los residuos de productos químicos en la UPV*. Para ello, se han depositado en bidones convenientemente etiquetados en función de sus características, para su almacenamiento y posterior retirada por la empresa contratada para su gestión.

7. Conclusiones

Se han desarrollado tres métodos para el control de calidad de los principios activos contenidos en los productos acorde con la Farmacopea Europea, logrando una reproducibilidad y precisión que permiten llevar a cabo el estudio de estabilidad los mismos.

7.1. Árbol del té

Los resultados obtenidos en los análisis indican que todos los principios activos se encuentran dentro del rango especificado por la Farmacopea. El uso del patrón interno ha conseguido eliminar el error originado por la inyección manual de la muestra en el equipo. El método de normalización de áreas ha permitido calcular la concentración relativa de los componentes en tanto por cien. El uso de patrones externos ha hecho posible la cuantificación absoluta de los compuestos mediante la realización de rectas de calibrado de tres puntos. En el estudio de estabilidad realizado se ha observado la degradación de los principios activos así como la formación de subproductos en consecuencia.

7.2. Hipérico

El método desarrollado ha permitido la identificación y cuantificación de la hipericina contenida en el producto. Los resultados obtenidos en los análisis indican que el contenido en hipericinas totales se encuentra por encima del límite establecido en el control de calidad de la empresa.

7.3. Solar

Con el método desarrollado se ha conseguido la extracción individual del β -Caroteno y del α -Tocoferol así como su identificación y cuantificación por medio de patrones externos. Los resultados obtenidos son del orden de magnitud esperada, en este caso no hay límite superior e inferior establecido.

Bibliografía

- [1] - <http://www.ine.es/>
- [2] - <http://www.portalfarma.com/>
- [3] - NORMAS REGULADORAS PARA LA ASIGNACIÓN DEL CÓDIGO NACIONAL DE PARAFARMACIA. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
- [4] - Bruneton, Jean. Fitoterapia (2004).
- [5] - Bruneton, Jean. Farmacognosia: fitoquímica: plantas medicinales (2001).
- [6] - <http://www.infobiologia.net/2011/08/heterosidos.html>
- [7] - <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema6.pdf>
- [8] - M. Paz Arraiza. PRINCIPIOS ACTIVOS EN PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS (2008).
- [9] - A. IVONNE JARA BELTRÁN. ANALISIS FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE Piper imperiale (Piperaceae) (2013).
- [10] - Análisis fitoquímico. Revista Colombia Forestal Vol 12: 161-170. Diciembre 2009.
- M. López Serrano. Manual de plantas medicinales para Guinea Ecuatorial (2012).
- Dra. Grisel Bérriz. Fitoterapia. Apiterapia y propóleos. Técnicas de relajación (2012).
- <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>
- European Pharmacopoeia
- Pomeranz, Yeshajahu. Food analysis: Theory and practice (1980).
- E. Díaz. Caracterización y efectos biológicos de un factor lipídico bioactivo aislado del vítreo bovino (2004).
- O. Hernán. Relación entre el Contenido de Caroteno, Color y Características Botánicas del Polen Corbicular (2004).
- A.Lampi. ANALYSIS OF TOCOPHEROLS AND TOCOTRIENOLS BY HPLC (2011).
- Joseph Schierle, Bernd Pietsch, Alan Ceresa, and Christian Fizez. Method for the Determination of β -Carotene in Supplements and Raw Materials by Reversed-Phase Liquid Chromatography: Single Laboratory Validation (2008).
- Mercedes Márquez, Carmen E. Yépez, Rosalía Sutil-Naranjo y Manuel Rincón. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A (2002).