

15-Enero-2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

**[REPORTE FINAL DE SERVICIO  
SOCIAL]**

CASTELLANOS AGUIRRE NOHEMI

## **INFORME DE SERVICIO SOCIAL**

### **Datos Generales:**

**Nombre:** Nohemí Castellanos Aguirre

**Matricula:** 2132035246

**Lugar de realización:** Procesos y Reactivos Químicos S.A de C.V

**Periodo:** 7 meses (3 de junio del 2019 al 3 de enero del 2020)

**Unidad:** Xochimilco

**División:** Ciencias Biológicas y de la Salud

**Licenciatura:** Química Farmacéutica Biológica

**Nombre del proyecto:** Instalación de una planta de producción de aceites esenciales

**Asesor Interno:** M. en C. Berta Retchkiman Corona

**Asesor externo:** Dr. Ricardo Yáñez Ortega

## INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos como metabolitos secundarios de plantas <sup>(28)</sup>, alrededor de 50 compuestos de monoterpenos, sesquiterpenos, aldehídos, cetonas y fenoles. Los monoterpenos son las moléculas más abundantes, llegando a representar hasta el 90% del aceite. Entre los mayoritarios destacan los monoterpenos oxigenados (ej. 1,8-cineol, linalol, alcanfor, carvacrol), monoterpenos hidrocarbonados (ej.  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, p-cimeno) y ésteres monoterpénicos (ej. acetato de linalilo) <sup>(18)</sup>.

Esta composición puede variar considerablemente a nivel intraespecífico dependiendo del genotipo, de las condiciones de extracción y de factores ambientales como las condiciones climáticas, localización geográfica y fecha de recolección. De ahí que algunas de las principales fuentes de aceites esenciales se reconozcan como variedades, ecotipos y/o quimiotipos diferentes. <sup>(18)</sup>

A esta variabilidad en la composición química de los aceites esenciales se encuentra asociada una gran multifuncionalidad como consecuencia de la capacidad de éstos de interactuar con receptores específicos de múltiples dianas biológicas. En este sentido, muchos de los aceites esenciales destacan por ser eficientes insecticidas frente a una amplia gama de insectos además de poseer actividad antimicrobiana y fitotóxica. <sup>(18)</sup>

Respecto a su distribución, un aceite esencial puede localizarse en un determinado órgano vegetal: flores, hojas, frutos y hasta en las raíces. Estas esencias se producen en glándulas especiales formadas por células secretoras arregladas para formar una bolsa donde se acumula el aceite esencial. El rendimiento de esencia obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento del peso del vegetal hasta valores que van desde el 1% al 3%. <sup>(21)</sup>

En gimnospermas y angiospermas es donde aparecen las principales especies que contienen aceites esenciales, distribuyéndose dentro de unas 60 familias. Son particularmente ricas en esencias las pináceas, lauráceas, mirtáceas, labiáceas, umbelíferas, rutáceas y compuestas. <sup>(21)</sup>

Más del 90% de la producción de aceites esenciales se utiliza como materia prima en la industria de la cosmética (perfumes y productos para la piel y el cabello), industria alimentaria (aromatizantes), industria farmacéutica (antimicrobianos) y en herboristería (aromaterapia). Alrededor de 3000 especies de plantas pertenecientes a 10 familias botánicas se utilizan para la obtención de aceites esenciales, sin embargo, sólo 300 de estos aceites se comercializan en el mercado mundial. <sup>(18)</sup>

El presente trabajo tiene como objetivo describir las propiedades físico-químicas, métodos de obtención (principal y alternativo), toxicidad, actividad farmacológica, controles de calidad, ensayos de identidad y el método de conservación adecuado para cada uno de los aceites esenciales tales como: Lavanda (*Lavándula angustifolia*), Limón (*Citrus limón*, *Citrus aurantifolia Swingle*), Menta (*Mentha x piperita L.*), Naranja (*Citrus sinensis (L) Osbeck*) y Eucalipto (*Eucalyptus spp*) para llevar a cabo la instalación de una planta de producción de aceites esenciales.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- a. Instalar una planta de producción de aceites esenciales
- b. Conocer las propiedades químicas de los aceites esenciales

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Conocer la composición química, actividad farmacológica, toxicología de cada uno de los aceites esenciales.
- b. Conocer las normas vigentes para que el aceite esencial sea considerado de calidad.
- c. Conocer el volumen de ventas en México en el año 2018.
- d. Conocer los métodos analíticos y los ensayos de identidad para llevar a cabo el control de calidad.
- e. Conocer el método de obtención adecuado para cada aceite esencial.

## **METODOLOGÍA UTILIZADA**

La metodología de trabajo a utilizar es:

- a. Realizar una revisión bibliográfica de los aceites esenciales a estudiar: conceptos básicos, composición química, actividad farmacológica, toxicidad, métodos de obtención (principal y alternativo), métodos analíticos, ensayos de identidad y conservación.
- b. Revisión de los Intervalos de porcentajes de los compuestos de los aceites esenciales según la Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
- c. Revisión del volumen de ventas de aceites esenciales en México en el año 2008.
- d. Revisión de los Métodos Generales de Análisis

## **ACTIVIDADES REALIZADAS**

- a. Investigación bibliográfica.
- b. Búsqueda, recolección, análisis y selección de información.

## **OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS**

Los objetivos alcanzados en este trabajo son:

- a. Conocer la composición química, actividad farmacológica, toxicología de cada uno de los aceites esenciales.
- b. Conocer las normas vigentes para que el aceite esencial sea considerado de calidad.

- c. Conocer los métodos analíticos y los ensayos de identidad para llevar a cabo el control de calidad.
- d. Conocer el método de obtención adecuado para cada aceite esencial.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Investigación bibliográfica de los siguientes aceites esenciales:

### 1.- Aceite esencial de lavanda

#### *Lavándula angustifolia*

El aceite de lavanda, según la farmacopea, procede de *Lavándula angustifolia*, mientras que los aceites procedentes de los híbridos, también utilizados, son conocidos entre los destiladores como aceite esencial de lavandín. Las hojas y sumidades floridas de la lavanda, contienen 1% de derivados térpenicos, ácido ursólico; cumarina y herniarina en forma de glucósido: ácido rosmarínico y picrosalvina. <sup>(3)</sup>

Los aceites esenciales puros de *Lavandula angustifolia* se utilizan en perfumería, cosmética, así como por sus propiedades antimicrobianas y gastrointestinales. <sup>(3)</sup>

**Descripción:** Líquido claro incoloro o ligeramente amarillo, con olor característico. <sup>(8)</sup>

**Solubilidad:** Miscible con etanol al 90 por ciento, éter dietílico y aceites grasos. <sup>(8)</sup>

#### 1.1.- Composición química

Tabla 1.- Composición química del aceite esencial de lavanda

Compuesto	%	Compuesto	%
A-Thuieno	0.13	A-Terpineol	0.06
$\alpha$ -pineno	0.51	cis-Carveol	0.11
Camfeno	0.26	Butirato de 2-metilhexilo	0.30
Thuja-2,4(10)-diene	0.13	Formato Isobornilo	0.06
Sabineno	0.31	Acetato linalilo*	21.74
$\beta$ -Pineno	0.14	Acetato de dihidro linaloilo	0.05
Octen-3-ol	0.22	Acetato de lavandulilo	2.42
3-Octanona	0.36	Acetate Terpeneoilo	0.20
Mirceno	0.12	Acetate Neriloilo	0.06
$\alpha$ -Felandreno	0.20	Acetato de geranoilo	0.10
1,4-Cineol	0.32	Dauceno	0.28
o-Cimeno	0.04	$\beta$ -Bourboneno	0.17
p-Cimeno	0.29	$\alpha$ -cis-Bergamoteno	0.07
Limoneno	1.10	(E)-Cariofileno	2.87
1,8-Cineol	3.98	Isoburato de lavandulilo	0.22
(Z)- $\beta$ -Ocimene	1.02	$\alpha$ -trans-Bergamoteno	0.07
(E)- $\beta$ -Ocimene	1.24	$\beta$ -Farneseno	4.02

<b>cis-Sabinene hidrato</b>	0.39	$\gamma$ -Muuroleno	0.06
<b>cis-Linalool oxido</b>	0.09	Germacrene D	0.77
<b>Terpinoleno</b>	0.10	(-)- $\beta$ -Bisaboleno	0.03
<b>Perilene</b>	0.16	Isovalerato de lavandulilo	0.07
<b>Linalol*</b>	35.96	trans- $\gamma$ -Cadinene	0.26
<b>Octen-1-ol-acetato</b>	0.06	$\delta$ -Cadinene	0.13
<b>Endo-fencol</b>	0.46	Espatulanol	0.06
<b>Camfor</b>	5.56	$\alpha$ -Muurolol	0.23
<b>trans-Pinocarveol</b>	0.18	$\alpha$ -Bisobolol	1.12
<b>Borneol</b>	2.71	Hidrocarburos monoterpénicos	5.59
<b>Lavandulol</b>	0.05	Monoterpenos oxigenados	83.20
<b>Terpinen-4-ol</b>	6.57	Hidrocarburos sesquiterpénicos	3.46
<b>m-Cimen-8-ol</b>	0.03	Sesquiterpenos oxigenados	6.69
<b>p-Cimen-8-ol</b>	0.33	Rendimiento (%)	0.50
<b>Neoisomentol</b>	1.31		

Tomado y modificado del libro: **Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida.**<sup>(12)</sup>

### 1.2.- Actividad farmacológica

Actúa como un sedante, relajante, tónico del sistema nervioso, analgésica y antiespasmódica.<sup>(19)</sup>

También presenta una actividad ansiolítica, antidepresiva y anticonvulsionante debida a su componente mayoritario linalol. Este compuesto modula la transmisión glutamatérgica actuando como antagonista competitivo del glutamato sobre los receptores NMDA y disminuyendo la liberación de glutamato inducida por potasio. En el hombre, la inhalación del aceite esencial de lavanda provoca una disminución de la presión arterial, frecuencia cardíaca y temperatura de la piel, así como un incremento de la actividad alfa y theta en diferentes regiones cerebrales y una mejora del estado de ánimo, produciendo un efecto de relajación. En clínica, administrado por vía oral, ha mostrado eficacia similar a la del lorazepam y la paroxetina en pacientes con trastorno de ansiedad generalizada.<sup>(20)</sup>

### 1.3.- Toxicidad

Produce efectos narcóticos y estupefacientes.<sup>(7)</sup>

### 1.4.- Métodos de obtención

**Principal:**



**Destilación por arrastre de vapor**<sup>(20)</sup> (Ver anexo 1).

**Alternativo:**

**Hidrodestilación**<sup>(20)</sup> (Ver anexo 1).

### 1.5.- Métodos analíticos

**Cromatografía de gases equipado con un detector de ionización de flama.**<sup>(3)</sup>

**Perfil cromatográfico.** MGA 0241. Gases. Usar el procedimiento de normalización.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 1.** Disolver 5 µL de limoneno, 5 µL de cineol, 5 µL de 3-octanona, 5 mg de alcanfor, 40 µL de linalol, 50 µL acetato de linalilo, 10 µL de terpin-4-ol, 5 µL de acetato de lavandulilo, 5 µL lavandulol, y 5 mg de α-terpineol en heptano y diluir a 10 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 2.** Disolver 5 µL de limoneno en heptano y diluir a 50 mL con el mismo disolvente. Diluir 0.5 mL de la solución a 5.0 mL con heptano.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Disolver 200 µL del aceite a examinar en heptano y diluir a 10.0 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre helio, velocidad de flujo 1.5mL/min; detector de ionización de flama; columna de sílice fundido, de 60 m x 0.25 mm, recubierta con macrogol 20 000 (0.25 µm). Temperatura de la columna a 70°C durante 15 min, aumentar la temperatura a incrementos de 2°C/min hasta 180°C; temperatura del detector y del inyector a 220°C con proporción de división de flujo de 1:50.<sup>(8)</sup>

**Verificación del sistema.** Inyectar 1.0 µL de la preparación de referencia 1. Registrar el cromatograma y medir las áreas de respuesta bajo los picos, la resolución no es menor de 1.4 entre los picos del terpinen-4-ol y acetato de lavandulilo.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 1.0 µL de la preparación de referencia 1 y de la muestra. Cuando los cromatogramas se realizan bajo las condiciones mencionadas con anterioridad, los componentes eluyen en el orden indicado en la composición de la preparación de referencia. Registrar los tiempos de retención. Identificar los componentes en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra.<sup>(8)</sup> Calcular el porcentaje de cada una de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos<sup>(8)</sup>:

**Tabla 2.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de lavanda.**

Compuesto	Intervalo
<b>Limoneno</b>	No más de 1.0 por ciento
<b>1,8-Cineol</b>	No más de 2.5 por ciento
<b>3-Octanona</b>	Entre 0.1 por ciento a 5.0 por ciento
<b>Alcanfor</b>	No más de 1.2 por ciento
<b>Linalol</b>	Entre 20.0 por ciento a 45.0 por ciento
<b>Acetato de linalilo</b>	Entre 25.0 por ciento a 47.0 por ciento
<b>Terpinen-4-ol</b>	Entre 0.1 por ciento a 8.0 por ciento
<b>Acetato de lavandulilo</b>	No menos de 0.2 por ciento
<b>Lavandulol</b>	No menos de 0.1 por ciento
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	No más de 2.0 por ciento
<b>Límite de exclusión</b>	0.05 por ciento, con la preparación de referencia 2

Obtenido de: **Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013.** <sup>(8)</sup>

**Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.** <sup>(26)</sup>

### 1.6.- Ensayos de identidad

**A. MGA 0241.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. Los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra son similares a los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de referencia 1. <sup>(8)</sup>

### **B. MGA-FH 0050**

**Soporte.** Gel de sílice GF<sub>254</sub> (de 5 a 40  $\mu\text{m}$  o de 2 a 10 $\mu\text{m}$ ). <sup>(8)</sup>

**Fase móvil.** Mezcla de acetato de etilo:tolueno (5:95). <sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia.** Disolver 10  $\mu\text{L}$  de linalol, 10  $\mu\text{L}$  de cineol y 10  $\mu\text{L}$  de acetato de linalilo en 1 mL de tolueno. <sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Disolver 20  $\mu\text{L}$  del aceite a examinar en 1 mL de tolueno. <sup>(8)</sup>

**Revelador.** SR de anisaldehído. <sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Aplicar por separado en bandas de 10mm (o 6 mm), 10  $\mu\text{L}$  (o 2  $\mu\text{L}$ ) de cada preparación. Desarrollar la cromatoplaca y permitir que el frente del eluyente recorra el 90 por ciento de la longitud de la placa. Secar al aire. Rociar el revelador, calentar a 105°C durante 5 min y examinar bajo luz natural. <sup>(8)</sup>

**Interpretación.** El cromatograma obtenido con ambas preparaciones exhibe en el tercio inferior una mancha café o violeta que corresponde en color y posición al linalol, adicionalmente, exhibe otra mancha de color café-violeta que se encuentra arriba del linalol y corresponde al cineol, también exhibe en el tercio medio, una mancha violeta o café correspondiente al acetato de linalilo. El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra puede presentar manchas adicionales.<sup>(8)</sup>

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.878 y 0.892.<sup>(8)</sup>

**Rotación óptica. MGA 0771.** De -12.5° a -6.0°.<sup>(8)</sup>

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.455 y 1.466.<sup>(8)</sup>

**Índice de acidez. MGA 0001.** No más de 1.0, determinar en 5.0 g del aceite a examinar disuelto en 50 mL de una mezcla de alcohol:éter de petróleo (Punto de ebullición 100° a 120°).<sup>(8)</sup>

**Pureza quiral. MGA 0241.** Gases. Contiene no más del 12 por ciento de (*S*)-linalol y no más del 1 por ciento de (*S*)-acetato de linalilo.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia.** Disolver 10 µL de linalol (mezcla de (*R*)-linalol y (*S*)-linalol), adicionar 5 mg de borneol y 10 µL acetato de linalilo (mezcla (*R*) acetato de linalilo y (*S*) acetato de linalilo) en pentano y diluir a 10 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Disolver 0.02 g del aceite a examinar en pentano y diluir a 10 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre: helio, velocidad de flujo 1.3mL/min; detector de ionización de flama; columna de sílice fundido, de 25 m x 0.25mm, fase estacionaria β-ciclodextrina modificada para cromatografía quiral (0.25 µm). Temperatura de la columna a 50°C y aumentar en incrementos de 2°C/min hasta 180°C; temperatura del detector y del inyector a 230°C con una proporción de división de flujo de 1:30.<sup>(8)</sup>

**Verificación del sistema.** Inyectar 1.0 µL de la preparación de referencia. Registrar el cromatograma y medir las áreas de respuesta bajo los picos la resolución no es menor a 5.5 entre los picos del (*R*)-linalol y (*S*)-linalol; no es menor de 2.9 entre los picos (*S*)-linalol y borneol; no es menor de 2.0 entre los picos del (*R*)-acetato de linalilo y (*S*)-acetato de linalilo.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 1.0 µL de cada una de las preparaciones. Cuando los cromatogramas se realizan bajo las condiciones mencionadas con anterioridad, los componentes eluyen en el siguiente orden (*R*)-linalol, (*S*)-linalol, borneol, (*R*)-acetato de linalilo y (*S*)-acetato de linalilo, dependiendo del estado de la columna y

las condiciones de operación, el borneol puede eluir antes o después del (S)-linalol. Registrar los tiempos de retención. Calcular el contenido en por ciento de los (S)-enantiómeros especificados, utilizando la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$\frac{As}{As + Ar} \times 100$$

**Dónde:**

As=área del pico del (S)-enantiómero correspondiente

Ar=área del pico del (R)-enantiómero correspondiente

**Conservación.** En envases herméticos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.<sup>(8)</sup>

## 2.- Aceite esencial de menta

### *Mentha x piperita* L.

El género *mentha* agrupa 25 especies de hierbas perennes, rizomatozas y aromáticas originarias de zonas templadas del hemisferio norte. Dentro de los vegetales que se suelen llamar mentas se incluyen, entre otras, a las especies *M.rotundifolia* CL.Hunds., *M. citrata* Ehrh y *M. pulegium* L.<sup>(16)</sup>

La *Mentha piperita* Linn es una de las plantas medicinales más utilizadas por el hombre moderno. Pertenece a la familia de las Labiadas y se conoce como toronjil de menta, menta inglesa, entre otros. Es una hierba aromática con el tallo ramoso y flores pequeñas en verticilos blancos.<sup>(17)</sup>

**Descripción.** Líquido incoloro de amarillo claro a amarillo verdoso, olor y sabor característicos, seguidos por una sensación refrescante. <sup>(8)</sup>

**Solubilidad.** Miscible con alcohol y cloruro de metileno. <sup>(8)</sup>

### 2.1.-Composición química

**Tabla 3.- Composición química del aceite esencial de menta**

Compuesto	%	Compuesto	%
(-) mentol	30-40 hasta 50	(-) mentona	15-25
(-) metil acetato	4-10	(-) mentofurano	
(+) isomentona		Carvona	
(+) pulegona	80-90	(+) neomentol	
(-) piperitenona		Jasmona	<1

Tomado y modificado de: **Plantas medicinales de uso en Chile (Química y farmacología).**<sup>(16)</sup>

## 2.2.-Actividad farmacológica

Presenta actividad antiespasmódica, analgésica, tónico digestivo y favorece la sudoración.<sup>(19)</sup>

Presentan un efecto antiviral, antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatorio y espasmolítico<sup>(17)</sup>, aromática, carminativa (favorece la expulsión de los gases del tubo digestivo), colagoga (facilita la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar), diurético, tónica.<sup>(14)</sup>

## 2.3.- Toxicidad

Produce efectos convulsionantes.<sup>(7)</sup>

El aceite es tóxico si se ingiere, puede causar dermatitis, el mentol puede causar reacciones alérgicas.<sup>(14)</sup>

## 2.4.- Métodos de obtención

### Principal:

**Destilación por arrastre de vapor** de las partes frescas de la planta que se encuentran al descubierto<sup>(14)</sup> (Ver anexo 1).

**Hidrodestilación** mediante un aparato de tipo Clevenger durante 3 horas<sup>(14)</sup> (Ver anexo 1).

### Alternativo:

**Enflorado (“euflorage”)**<sup>(14)</sup> (Ver anexo 1).

## 2.5.- Métodos analíticos

**Cromatografía de gases acoplado a un detector por espectrometría de masas.**<sup>(8)</sup>

**Perfil cromatográfico.** MGA 0241. Gases. Usar el procedimiento de normalización.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 1.** Disolver 10 µL de limoneno, 20 µL de cineol, 40 µL de mentona, 10 µL de mentofurano, 10 µL de isomentona, 40 µL de acetato de mentilo, 20 µL de isopulegol, 60 mg de mentol, 20 µL de pulegona, 10 µL de

piperitona y 10 µL de carvona en heptano y diluir a 10.0 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 2.** Disolver 5 µL de isopulegol en heptano y diluir a 10 mL con el mismo disolvente. Diluir 0.1 mL a 5 mL con heptano.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Mezclar 0.20 g del aceite a examinar con heptano y diluir a 10.0 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre: helio, velocidad de flujo 1.5mL/min; detector de ionización de flama; columna de sílice fundido, de 60 m x 0.25 mm, recubierta con macrogol 20 000 (0.25 µm). Temperatura de la columna a 60°C durante 10 min, aumentar la temperatura a incrementos de 2°C/min hasta 180°C mantener esta temperatura durante 5 min, temperatura del detector a 220°C y del inyector 200°C con una proporción de división de flujo de 1:50.<sup>(8)</sup>

**Verificación del sistema.** Inyectar 1.0 µL de la preparación de referencia 1. Registrar el cromatograma y medir las áreas de respuesta bajo los picos, la resolución no es menor de 1.5 entre los picos del limoneno y cineol y no es menor de 1.5 entre los picos de piperitona y carvona.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 1.0 µL de la preparación de referencia 1 y de la preparación de la muestra. Los componentes eluyen en el orden indicado en la composición de la preparación de referencia 1. Registrar los tiempos de retención. Identificar los componentes en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Descartar el pico del heptano. Calcular el porcentaje de cada uno de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos<sup>(8)</sup>;

**Tabla 4.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de menta.**

Compuesto	Intervalo
Limoneno	Entre el 1.0 por ciento y 5.0 por ciento
Cineol	Entre el 3.5 por ciento y 14.0 por ciento
Mentona	Entre el 14.0 por ciento y 32.0 por ciento
Mentofurano	Entre 1.0 por ciento y 9.0 por ciento
Isomentona	Entre el 1.5 por ciento y 10.0 por ciento
Acetato de mentilo	Entre el 2.8 por ciento y 10.0 por ciento
Isopulegol	No más del 0.2 por ciento
Mentol	Entre 30.0 por ciento y 55.0 por ciento
Pulegona	No más del 4.0 por ciento
Carvona	No más del 1.0 por ciento

<b>Límite de exclusión</b>	0.05 por ciento, con la preparación de referencia 2
<b>La proporción del contenido de cineol respecto al contenido de limoneno no es menor de 2.</b>	

**Tomado de: Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013<sup>(8)</sup>**

## **2.6.- Ensayos de identidad**

**A. MGA 0241. Gases.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. Los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra son similares a los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de referencia. La carvona y pulegona pueden estar presentes en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra.<sup>(8)</sup>

**B. MGA-FH 0050.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba para *Aceite de menta*.<sup>(8)</sup>

**Interpretación 1.** El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra, exhibe en el tercio medio manchas que corresponde a carvona y pulegona. El cromatograma obtenido con la preparación de referencia exhibe en el tercio medio, por encima de las manchas de carvona y pulegona, una mancha que corresponde al timol.<sup>(8)</sup>

**Interpretación 2.** El cromatograma obtenido con ambas preparaciones exhibe en el tercio inferior una mancha azul intenso a violeta que corresponde en color y posición al mentol; adicionalmente, exhibe en la parte inferior del tercio medio, una mancha de color azul-violeta a café que corresponde a cineol, también exhibe en la parte superior del tercio medio, una mancha azul-violeta que corresponde a acetato de mentilo. El cromatograma obtenido con la preparación de referencia exhibe entre la mancha de cineol y acetato de mentilo, una mancha rosa correspondiente a timol. El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra exhibe en el tercio medio manchas de color rosa pálido, azul-grisáceo o verde-grisáceo correspondientes a carvona, pulegona e isomentona; la parte superior del tercio medio y por debajo de la mancha de acetato de mentilo, exhibe una mancha azul-grisácea correspondiente a mentona. En el tercio superior exhibe una mancha café amarilla que corresponde a mentofurano. Puede presentar otras manchas adicionales.<sup>(8)</sup>

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.900 a 0.916.<sup>(8)</sup>

**Rotación óptica. MGA0771.** Entre -10° a -30°.<sup>(8)</sup>

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.457 y 1.467.<sup>(8)</sup>

**Índice de acidez. MGA 0001.** No mayor de 1.4, determinar en 5.0 g del aceite a examinar diluido en 50 mL de una mezcla de alcohol:éter de petróleo (punto de ebullición de 100°C a 120°C).<sup>(8)</sup>

**Aceites grasos y aceites esenciales resinificados.** Cumple los requisitos.

Dejar caer una gota del aceite esencial sobre un papel filtro. La gota se evapora completamente dentro de las 24 h siguientes sin dejar rastro de cualquier mancha traslúcida o grasosa.<sup>(8)</sup>

### **Aceite de menta**

#### **A.MGA-FH 0050**

**Soporte.** Gel de sílice GF<sub>254</sub>.<sup>(8)</sup>

**Fase móvil.** Mezcla de acetato de etilo:tolueno (5:95).<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia.** Disolver 50 mg de mentol, 20 µL de cineol, 10 mg de timol y 10 µL de acetato de mentilo en tolueno y diluir a 10 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Mezclar 0.1 g del aceite a examinar con tolueno y diluir a 10 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Revelador.** SR de anisaldehído.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Aplicar por separado en bandas, 10 µL de la preparación de referencia y 20 µL de la preparación de la muestra. Desarrollar la cromatoplaque y permitir que el frente del eluyente recorra el 90 por ciento de la longitud de la placa. Secar al aire, examinar bajo lámpara de luz UV a 254 nm. Rociar el revelador y calentar a 105°C durante 5 min. Examinar bajo luz natural.<sup>(8)</sup>

**Interpretación.** El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra no exhibe una mancha azul entre las manchas de cineol y mentol.<sup>(8)</sup>

**B.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra no exhibe un pico con el tiempo de retención del isopulegol y un área mayor a 0.2 por ciento del área total.<sup>(8)</sup>

**Conservación.** En envases herméticos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.<sup>(8)</sup>

### **3.- Aceite esencial de limón**



## **Citrus limón**

### **Citrus aurantifolia Swingle**

El aceite esencial de limón, es el principal subproducto de la elaboración de jugo concentrado. Se denomina "aceite esencial o esencia natural de limón" al producto volátil obtenido del epicarpio fresco del fruto (*Citrus limón*).<sup>(4)</sup>

**Descripción.** Líquido de color amarillo pálido a verde amarillento; posee un aroma fresco que recuerda a la cáscara madura del fruto.<sup>(8)</sup>

**Solubilidad.** Soluble en alcohol o éter y poco soluble en agua.<sup>(8)</sup>

El principal constituyente químico del aceite esencial de limón, es el limoneno que representa algo más del 60%.<sup>(4)</sup>

### **3.1.-Composición química**

El aceite de limón, contiene aproximadamente 2% de sustancias no volátiles en su mayoría en la forma de Coumarinas, alrededor de 18 alcoholes, 16 aldehídos, 11 ésteres, 3 cetonas, 4 ácidos, y 23 hidrocarburos. Los componentes mayoritarios del aceite esencial obtenido de la cáscara son<sup>(5)</sup>:

**Tabla 5.- Composición química del aceite esencial de limón**

Compuesto	%
Limoneno	63
$\beta$ -pineno	12
$\gamma$ -terpineno	9
Geranial	1.5
Neral	1.0
neril acetato	0.5
geranil acetato	0.4
citronelal	0.2
linalol	0.2
nonanal	0.1

**Tomado y modificado de: Introducción a la obtención de aceite esencial de limón<sup>(5)</sup>**

### **3.2.-Actividad farmacológica**

Después de la inhalación se presenta una disminución de la presión arterial y frecuencia cardíaca; también tienen un efecto relajante, disminuye el estrés y ansiedad, y mejora del estado de ánimo.<sup>(9)</sup>

Estos efectos son debidos, en parte, al limoneno, el cual, tras administración oral en rata, disminuye de forma significativa la concentración de glutamato en cerebro e

incrementa la de GABA. En condiciones de estrés inducido en rata, el limoneno reduce tanto el nivel de serotonina en hipotálamo y amígdala como el de corticosterona en sangre.<sup>(9)</sup>

### **3.3.- Toxicidad**

Produce efectos fototóxicos o irritantes sobre la piel.<sup>(7)</sup>

### **3.4.- Métodos de obtención**

**Principal:**

**Extracción por expresión o prensado**<sup>(27)</sup> (Ver anexo 1).

**Destilación por arrastre de vapor**<sup>(5)</sup> (Ver anexo 1).

**Alternativo:**

**Extracción con disolventes volátiles**<sup>(4)</sup> (Ver anexo 1).

**Centrifugado tipo “A”**<sup>(8)</sup> (Ver anexo 1).

**Centrifugado tipo “B”**<sup>(8)</sup> (Ver anexo 1).

**Destilado**<sup>(5)</sup> (Ver anexo 1).

**Destilado y desterpenado**<sup>(5)</sup> (Ver anexo 1).

**Destilación con agua**<sup>(5)</sup> (Ver anexo 1).

**Destilación con vapor saturado o destilación con agua y vapor**<sup>(27)</sup> (Ver anexo 1).

**Percolación**<sup>(27)</sup> (Ver anexo 1).

**Hidrodestilación**<sup>(1)</sup> (Ver anexo 1).

### **3.5.- Métodos analíticos**

Cromatografía de gases acoplado a un detector por espectrometría de masas.<sup>(1)</sup>

## **4.- Aceite esencial de naranja**

***Citrus sinensis* (L.) Osbeck**

Este aceite se encuentra en la cáscara de naranja.

La naranja dulce pertenece a la familia de las Rutáceas, una familia muy amplia que contiene unas 1700 especies de plantas que crecen en países de clima cálido y templado, siendo el continente africano donde más especies se pueden encontrar. De la anterior familia, las plantas más conocidas son los cítricos, especies que están incluidas en el género *Citrus*, al cual pertenecen la naranja común (*Citrus sinensis*), la naranja china (*Citrus japonica*), la naranja amarga (*Citrus aurantium*), la mandarina (*Citrus reticulata*), el limón (*Citrus limon*), el pomelo (*Citrus paradisi*), la lima (*Citrus aurantifolia*) o la toronja (*Citrus medica*).<sup>(24)</sup>

La calidad del aceite depende de factores que influyen sobre la composición como las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etcétera.), edad de la planta y estado fenológico, método de cultivo (uso de fertilizantes, abono, pesticidas, otros químicos, etcétera.), época de recolección, modo de manejo y almacenamiento del material vegetal (fresco, seco, fermentado, etcétera.) y método de obtención del aceite (destilación, maceración, prensado, extracción con solventes, extracción con fluidos supercríticos, etcétera).<sup>(26)</sup>

**Descripción.** Líquido amarillo a anaranjado, olor y sabor característicos, puede enturbiarse a bajas temperaturas.<sup>(8)</sup>

**Solubilidad.** Miscible con etanol, sulfuro de carbono, poco soluble en agua, soluble en 2 volúmenes de etanol al 90 por ciento, en un volumen de ácido acético glacial.<sup>(8)</sup>

#### 4.1.-Composición química

**Tabla 6.- Composición química del aceite esencial de naranja**

Compuesto	%	Tiempo de retención
<b>α- pineno</b>	0.532	5.212
<b>β-felandreno</b>	0.492	7.187
<b>β-mirceno</b>	1.753	8.109
<b>D-limoneno</b>	90.967	9.238
<b>γ-terpinoleno</b>	1.649	10.794
<b>Octanal</b>	0.199	12.564
<b>Decanal</b>	0.230	18.030
<b>Linalol</b>	1.267	19.197
<b>Octanol</b>	0.532	19.534
<b>Compuestos no identificados</b>		2.379

Tomado y modificado de: Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de la cáscara de naranja.<sup>(26)</sup>

#### 4.2.-Actividad farmacológica

Después de la inhalación se presenta una disminución de la presión arterial y frecuencia cardíaca; también tienen un efecto relajante, disminuye el estrés y ansiedad, y mejora del estado de ánimo.<sup>(9)</sup>

Estos efectos son debidos, en parte, al limoneno, el cual, tras administración oral en rata, disminuye de forma significativa la concentración de glutamato en cerebro e incrementa la de GABA. En condiciones de estrés inducido en rata, el limoneno reduce tanto el nivel de serotonina en hipotálamo y amígdala como el de corticosterona en sangre.<sup>(9)</sup>

También tiene efectos antidepresivos, antiinflamatorios, antisépticos, antiespasmódicos, descongestivo, carminativos (disminución de la generación de gases en el tubo digestivo), sedantes y refrescantes.<sup>(13)</sup>

#### **4.3.- Toxicidad**

Produce efectos fototóxicos o irritantes sobre la piel.<sup>(7)</sup>

#### **4.4.- Métodos de obtención**

**Principal:**

**Destilación por arrastre con vapor**<sup>(13)</sup> (Ver anexo 1).

**Expresión o prensado de la cáscara**<sup>(26)</sup> (Ver anexo 1).

**Alternativo:**

**Extracción con solvente**<sup>(24)</sup> (Ver anexo 1).

**Extracción con fluidos supercríticos**<sup>(26)</sup> (Ver anexo 1).

**Hidrodestilación**<sup>(26)</sup> (Ver anexo 1).

**Hidrodestilación asistida por microondas**<sup>(24)</sup> (Ver anexo 1).

#### **4.5.- Métodos analíticos**

**Cromatografía de gases de alta resolución usando un detector de masas.**<sup>(23)</sup>

**Perfil cromatográfico. MGA 0241. Gases.** Usar el procedimiento de normalización.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 1.** Disolver 10  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -pineno, 10  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -pineno, 10  $\mu\text{L}$  de sabineno, 20  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mirceno, 800  $\mu\text{L}$  de limoneno, 10  $\mu\text{L}$  de octanal, 10  $\mu\text{L}$

de decanal, 10  $\mu$ L de linalol, 10  $\mu$ L de citral (compuesto de neral y geranial), 10  $\mu$ L de valenceno en 1 mL de acetona.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 2.** Disolver 5  $\mu$ L de  $\beta$ -pineno en 10 mL de acetona, tomar una alícuota de 0.5 mL y diluir a 10 mL con acetona.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Diluir 300  $\mu$ L del aceite esencial a examinar a 1 mL de acetona.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre: helio, velocidad de flujo 1.0 mL/min; detector de ionización de flama; columna de sílice fundido, de 30 x 0.53 mm, recubierta con macrogol 20 000 (1  $\mu$ m). Mantener la temperatura de la columna a 50°C durante 6 min, después aumentar la temperatura en incrementos de 0.25°C/min hasta 150°C, incrementar nuevamente la temperatura en incrementos de 0.33°C/min hasta 180°C y mantener la temperatura durante 14 min; temperatura del detector e inyector a 250°C con una proporción de división de flujo de 1:100.<sup>(8)</sup>

**Verificación del sistema.** Inyectar 0.5  $\mu$ L de la preparación de referencia 1. Registrar el cromatograma y medir las áreas de respuesta bajo los picos, la resolución no es menor de 3.9 entre, los picos de  $\beta$ -pineno y sabineno y no es menor a 1.5 entre los picos correspondientes al valenceno y geranial.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 0.5  $\mu$ L de cada una de las preparaciones. Los componentes eluyen en el orden indicado en la composición de la preparación de referencia 1. Registrar los tiempos de retención. Con los tiempos de retención determinados en el cromatograma de la preparación de referencia 1. Identificar los componentes en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra.<sup>(8)</sup>

Calcular el porcentaje de cada uno de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización, usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos<sup>(8)</sup>:

**Tabla 7.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de naranja.**

Compuesto	Intervalo
$\alpha$ -Pineno	Entre 0.4 por ciento y 0.6 por ciento
$\beta$ -pineno	Entre 0.2 por ciento y 0.3 por ciento
Sabineno	Entre 0.2 por ciento y 1.1 por ciento
$\beta$ -Mirceno	Entre 1.7 por ciento y 2.5 por ciento
Limoneno	Entre 92 por ciento y 97.0 por ciento
Octanal	Entre 0.1 por ciento y 0.4 por ciento
Decanal	Entre 0.1 por ciento y 0.4 por ciento

<b>Linalol</b>	Entre 0.2 por ciento y 0.7 por ciento
<b>Neral</b>	Entre 0.02 por ciento y 0.10 por ciento
<b>Valenceno</b>	Entre 0.02 por ciento y 0.5 por ciento
<b>Geranial</b>	Entre 0.03 por ciento y 0.20 por ciento
<b>Límite de exclusión</b>	0.01 por ciento con la preparación de referencia 2

**Tomado de: Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013.<sup>(8)</sup>**

#### **4.6.- Ensayos de identidad**

**A. MGA 0241. Gases.** Examinar los cromatogramas obtenidos en el perfil cromatográfico. Los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra son similares a los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de referencia.<sup>(8)</sup>

**B.MGA-FH 0050.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba para *Determinación de bergapteno.*<sup>(8)</sup>

**Interpretación 1.** El cromatograma obtenido con la preparación de la referencia, exhibe en el tercio medio una mancha de fluorescencia amarillo-verdosa que corresponde a bergapteno. El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra exhibe en el tercio inferior varias bandas de fluorescencia azul y no presenta una mancha de fluorescencia amarillo-verdosa que corresponde al bergapteno.<sup>(8)</sup>

**Interpretación 2.** El cromatograma obtenido con ambas preparaciones exhibe en el tercio medio una mancha de fluorescencia anaranjado-pardusca que corresponde a linalol. El cromatograma obtenido con la preparación de referencia exhibe por debajo de la mancha de linalol una mancha de fluorescencia amarillo verdosa que corresponde a bergapteno. El cromatograma obtenido con ambas preparaciones exhibe en el tercio superior una mancha de fluorescencia anaranjado-pardusca que corresponde a acetato de linalilo. El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra puede presentar manchas adicionales.<sup>(8)</sup>

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.842 a 0.850.<sup>(8)</sup>

**Rotación óptica. MGA 0771.** De +94° a +99°.<sup>(8)</sup>

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.470 a 1.476.<sup>(8)</sup>

**Índice de peróxido. MGA 0681.** No más de 20.<sup>(8)</sup>

**Aceites grasos y aceites esenciales resinificados.** Cumple los requisitos. Dejar caer una gota del aceite esencial sobre papel filtro. La gota se evapora

completamente dentro de las 24 h siguientes sin dejar rastro de cualquier mancha traslúcida o grasosa.<sup>(8)</sup>

### **Determinación de bergapteno. MGA-FH 050**

**Soporte.** Gel de sílice GF 254.<sup>(8)</sup>

**Fase móvil.** Mezcla de acetato de etilo:tolueno (15:85).<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia.** Disolver 2 mg de bergapteno, 10 µL de linalol, 20 µL de acetato de linalilo en 10 mL de alcohol.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Disolver 0.2 mL del aceite esencial a examinar en 1 mL de alcohol.<sup>(8)</sup>

**Revelador.** SR de anisaldehído.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento para la detección 1.** Aplicar por separado en bandas 10 µL de cada preparación. Desarrollar la cromatoplaqueta y permitir que el frente del eluyente recorra el 90 por ciento de la longitud de la placa. Secar al aire y examinar bajo lámpara de luz UV a 365 nm.<sup>(8)</sup>

**Interpretación.** El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra no exhibe alguna mancha que corresponda con la mancha del bergapteno del cromatograma obtenido con la preparación de referencia.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento para la detección 2.** Rociar el revelador, calentar a 105°C durante 10 min y examinar bajo lámpara de luz UV a 365 nm.<sup>(8)</sup>

**Interpretación.** El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra no exhibe alguna mancha que corresponda con la mancha del bergapteno del cromatograma obtenido con la preparación de referencia.<sup>(8)</sup>

**Residuos de la evaporación. MGA 0411.** Entre 1.0 y 5.0 por ciento. Evaporar a sequedad 5.0 g del aceite esencial a examinar en baño de agua. Secar a 105°C durante 4 h.<sup>(8)</sup>

**Conservación.** En envases hermáticos, llenos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.<sup>(8)</sup>

## **5.- Aceite esencial de eucalipto**

### ***Eucalyptus spp.***

*Eucalyptus* es un género de árboles de la familia *Myrtaceae*, caracterizado por ser de rápido crecimiento.<sup>(11)</sup>

Existen alrededor de setecientas especies, la mayoría oriundas de Australia y muchas se conocen como "árbol gomero".<sup>(2)</sup>

Existen diferentes especies de Eucalipto entre las cuales se tienen <sup>(2)</sup>:

- *Eucalyptus botryoides*
- *Eucalyptus calophylla*
- *Eucalyptus camaldulensis* (*Eucalipto rojo*)
- *Eucalyptus citriodora*
- *Eucalyptus cladocalyx*
- *Eucalyptus crebra*
- *Eucalyptus deglupta*
- *Eucalyptus ficifolia*
- *Eucalyptus globulus*
- *Eucalyptus gummifera*
- *Eucalyptus lehmanni*
- *Eucalyptus obliqua*
- *Eucalyptus paniculata*
- *Eucalyptus pilularis*
- *Eucalyptus robusta* <sup>(2)</sup>

El eucalipto blanco o albar "*Eucalyptus globulus*" es la especie más frecuentemente usada de este género, a nivel mundial. Aparece de forma natural en el sur de Australia (Victoria), Tasmania y las islas del estrecho de Bass, además es cultivado en el sur de Europa y California.<sup>(15)</sup>

**Descripción.** Líquido incoloro o amarillo claro; olor característico y aromático, sabor pungente. Se oscurece ligeramente cuando se almacena en periodos largos.<sup>(8)</sup>

**Solubilidad.** Fácilmente soluble en etanol al 70 por ciento.<sup>(8)</sup>

### 5.1.-Composición química

Tabla 8.- Composición química del aceite esencial de eucalipto.

<i>E. globulus</i>		
Componente	%	Tiempo de retención
IR $\alpha$ -pineno	18,18	_5,0
(-)- $\beta$ -pineno	_0,69	_5,7
Desconocido	_0,78	_5,9
o-cimeno	_0,37	_6,5
Eucaliptol	_55,49	_6,6
Metil m-tolil carbinol	_0,21	_7,0
(-)-terpinen-4-ol	_0,33	_8,9
$\alpha$ -terpineol	_0,79	_9,1
Desconocido	_0,50	11,7



$\alpha$ -gurjuneno	_2,98	12,2
(+)-calereno	_0,39	12,5
Longiborn-2-eno	_8,15	12,6
(-)-alloaromadendreno	_2,09	12,9
Desconocido	_0,55	13,3
(+)-ledeno	_3,91	13,3
$\alpha$ -cadineno	_0,37	13,6
Desconocido	_0,48	14,1
Humulano-1,6-dien-3-ol	_0,21	14,2
(-)-isolongifolol acetato	2,34	14,4
Longifoleno	0,89	14,5
(+)-rosifoliol	0,30	14,9

<i>E. nitens</i>		
Compuesto	%	Tiempo de retención
IR- $\alpha$ -pineno	18,36	_5,0
(-)- $\beta$ -pineno	_0,59	_5,7
Desconocido	_0,39	_5,9
Desconocido	_0,29	_6,1
o-cimeno	_0,70	_6,5
m-menta-6,8-dieno	_5,66	_6,5
Eucaliptol	59,85	_6,6
Metil-m-tolil carbinol	_0,28	_7,0
Sabinil acetato	_0,27	_8,3
(-)-terpinen-4-ol	_0,31	_8,9
$\alpha$ -terpineol	_0,46	_9,1
Terpinil acetato	_5,01	11,3
$\alpha$ -gurjuneno	_0,89	12,2
(+)-calereno	_0,27	12,5
Longiborn-2-eno	_4,05	12,6
(-)-alloaromadendreno	_0,96	12,9
(+)-ledeno	_0,70	13,3
(-)-isolongifolol acetato	_0,69	14,4
Longifoleno	_0,26	14,5

Tomado y modificado de: ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill Y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (MYRTACEAE) PARA EL CONTROL DE *Sitophilus zeamais* Motschulsky.<sup>(11)</sup>

## 5.2.-Actividad farmacológica

Presenta actividad antiséptica, expectorante<sup>(19)</sup> y antibiótico contra *Bacillus Subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, insecticidas, bactericidas, bacteriostática.<sup>(2)</sup>

### 5.3.- Toxicidad

Produce efectos fototóxicos o irritantes sobre la piel, neurotóxicos.<sup>(6)</sup>

### 5.4.- Métodos de obtención

**Principal:**

**Hidrodestilación asistida por radiación microondas<sup>(10)</sup>** (Ver anexo 1).

**Alternativo:**

**Destilación por arrastre de vapor<sup>(11)</sup>** (Ver anexo 1).

### 5.5.- Métodos analíticos

**Cromatografía de gases.<sup>(8)</sup>**

**Perfil cromatográfico. MGA 0241. Gases.** Usar el procedimiento de normalización.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 1.** Disolver 10  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -pineno, 5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -pineno, 5  $\mu\text{L}$  de sabineno, 5  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -felandreno, 10  $\mu\text{L}$  de limoneno, 50  $\mu\text{L}$  de cineol y 5 mg de alcanfor en heptano y diluir a 10 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia 2.** Disolver 5  $\mu\text{L}$  de limoneno en heptano y diluir a 50.0 mL con el mismo disolvente. Diluir 0.5 mL de la solución a 5.0 mL con heptano.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Disolver 200  $\mu\text{L}$  del aceite a examinar en heptano y diluir a 10.0 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre: helio, velocidad de flujo 1.5mL/min; detector de ionización de flama; columna de sílice fundido, de 60 m x 0.25 mm, recubierta con macrogol 20 000 (0.25  $\mu\text{m}$ ). Temperatura de la columna a 90°C durante 5 min, aumentar la temperatura a incrementos de 5°C/min hasta 200°C y mantener durante 5 min; temperatura del detector y del inyector a 220°C con una proporción de división de flujo de 1:50.<sup>(8)</sup>

**Verificación del sistema.** Inyectar 1.0  $\mu\text{L}$  de la preparación de referencia 1. Registrar el cromatograma y medir las áreas de respuesta bajo los picos, la resolución no es menor de 1.5 entre los picos de limoneno y cineol.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 1.0  $\mu\text{L}$  de la preparación de referencia 1 y de la preparación de la muestra. Los componentes eluyen en el orden indicado en la composición de la preparación de referencia 1. Registrar los tiempos de retención. Identificar los componentes en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra.<sup>(8)</sup>

Calcular el porcentaje de cada uno de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos<sup>(8)</sup>:

**Tabla 9.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de eucalipto.**

Compuesto	Intervalo
$\alpha$ -Pino	Entre 0.05 por ciento y 10.0 por ciento
$\beta$ -Pino	Entre 0.05 por ciento y 1.5 por ciento
Sabineno	No más del 0.3 por ciento
$\alpha$ -Felandreno	Entre 0.05 por ciento y 1.5 por ciento
Limoneno	Entre 0.05 por ciento y 15.0 por ciento
1,8-Cineol	No menos de 70.0 por ciento
Alcanfor	No más de 0.1 por ciento
Límite de exclusión	0.05 por ciento, con la preparación de referencia 2

**Tomado de: Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013.**<sup>(8)</sup>

### 5.6.- Ensayos de identidad

**A. MGA 0241. CLAR.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. Los picos característicos de  $\alpha$ -pino,  $\beta$ -pino,  $\alpha$ -felandreno, limoneno y cineol en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra son similares a los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de referencia. Adicionalmente el sabineno y alcanfor pueden estar presentes en el cromatograma obtenido con la muestra.<sup>(8)</sup>

### **B. MGA FH-0050**

**Soporte.** Gel de sílice GF<sub>254</sub> (de 5 a 40  $\mu\text{m}$  o de 2 a 10  $\mu\text{m}$ ).<sup>(8)</sup>

**Fase móvil.** Mezcla de acetato de etilo:tolueno (1:9).<sup>(8)</sup>

**Preparación de referencia.** Disolver 20  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -terpineol y 50  $\mu\text{L}$  de cineol en tolueno y diluir 5 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Disolver 100 mg del aceite esencial a examinar en tolueno y diluir a 10 mL con el mismo disolvente.<sup>(8)</sup>

**Revelador.** SR de anisaldheido.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Aplicar por separado en bandas de 10 mm (o 6 mm), 10  $\mu$ L (o 2  $\mu$ L) de cada una de las preparaciones. Desarrollar la cromatoplaqueta y permitir que el frente del eluyente recorra el 90 por ciento de la longitud de la placa. Secar al aire. Rociar el revelador. Calentar a 105°C durante 5 min y examinar bajo la luz natural.<sup>(8)</sup>

**Interpretación.** El cromatograma obtenido con la preparación de referencia exhibe en el tercio inferior una mancha color café-violeta, que corresponde a  $\alpha$ -terpineol. El cromatograma obtenido con ambas preparaciones exhibe en el tercio medio, una mancha de color café-violeta intenso correspondiente a cineol. La preparación de la muestra puede presentar manchas adicionales.<sup>(8)</sup>

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.906 y 0.927.<sup>(8)</sup>

**Rotación óptica. MGA 0771.** Entre 0° y +10°.<sup>(8)</sup>

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.458 y 1.470.<sup>(8)</sup>

**Solubilidad en alcohol.** Soluble en 5 volúmenes de etanol al 70 por ciento (v/v).<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Colocar 10 mL del aceite esencial a examinar en una probeta de 25 mL con tapón esmerilado. Mantener a temperatura constante de 20°C  $\pm$  0.2°C. Utilizar una bureta de 20 mL y adicionar etanol al 70 por ciento (v/v) en incrementos de 0.1 mL hasta que se disuelva completamente, continuar adicionando en incrementos de 0.5 mL hasta 20 mL, agitar frecuentemente y vigorosamente. Registrar el volumen de etanol adicionado cuando se ha obtenido una solución clara. Si la solución se vuelve turbia u opalescente antes de que se agreguen los 20 mL de etanol al 70 por ciento (v/v), registrar el volumen añadido cuando la turbiedad u opalescencia aparezca.<sup>(8)</sup>

**Aldehídos. MGA 0991.** Colocar 10 mL del aceite a examinar en una probeta de vidrio con tapón esmerilado, agregar 5.0 mL de tolueno y 4.0 mL de solución SR de clorhidrato de hidroxilamina. Agitar y titular inmediatamente con SV hidróxido de potasio 0.5 M en etanol al 60 por ciento, hasta que el color rojo cambie a amarillo. Continuar la titulación sin dejar de agitar; el punto final se alcanza cuando después de agitar durante 2 min y dejar separar las capas, el color amarillo es permanente en la capa inferior. La reacción se completa en 15 min. Repetir la operación utilizando otros 10 mL de la muestra y como referencia para el punto final, el líquido titulado de la primera determinación, agregando 0.5 mL de SV de hidróxido de

potasio 0.5 M en alcohol al 60 por ciento. No se requiere más de 2.0 mL de SV de hidróxido de potasio 0.5 M para la segunda determinación.<sup>(8)</sup>

**Conservación.** En envases herméticos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.<sup>(8)</sup>

## **BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup>Andreatta, A. E., Longo<sup>1</sup>, M. B., Utrera, C., & Matías Saavedra, G. F. (s.f.). *CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DEL DEPARTAMENTO SAN JUSTO (CÓRDOBA)*.
- <sup>2</sup>Asdadi A., Alilou H., Akssira M., Hassani L. M. I., Chebli B., Moutaj R., González-Mas C., Blázquez A. M. (2014). *Chemical Composition and Anticandidal Effect of Three Thymus Species Essential Oils from Southwest of Morocco against the Emerging Nosocomial Fluconazole-Resistant Strains. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare www.iiste.org ISSN 2224-3208 (Paper) ISSN 2225-093X (Online) Vol.4, No.11.*
- <sup>3</sup>Camarena, M. M. (2015). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.*
- <sup>4</sup>Campos, E. O. (2007). *Generalidades del aceite esencial a partir de la corteza del limón (Citrus limonium) en la industria alimentaria. México: Universidad autónoma Agraria Antonio Narro División de Ciencia Animal.*
- <sup>5</sup>Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). *INTRODUCCIÓN A LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN. INVENIO.*
- <sup>6</sup>Docherty J. J., Smith J. S., Fu M. M., Stoner T., Booth T. (2004). *Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. Antivir Res; 61:19e26.*
- <sup>7</sup>Dufort, J. (2017). *Aceites esenciales: Una guía práctica para conocer las propiedades de los aceites esenciales y sus aplicaciones. esenciales ROBIN BOOK.*
- <sup>8</sup>FEUM (Farmacopea Herbolaria de los estados Unidos Mexicanos) (2013), *Segunda edición, México*
- <sup>9</sup>Fitoterapia, S. E. (2017). *Libro de resúmenes . Menorca.*
- <sup>10</sup>Gervacy, L. H. (2014). *“ESTUDIO COMPARATIVO EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO (EUCALIPTO GLÓBULUS LABILL) MEDIANTE EL MÉTODO DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR Y EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN ASISTIDO POR RADIACIÓN MICROONDAS”. FACULTAD DE INGENIERÍA DE PROCESOS ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA.*
- <sup>11</sup>González-Guiñez, R., Silva-Aguayo, G., Urbina-Parra, A., & Gerding-González, M. (2016). *ACEITE ESENCIAL DE Eucalyptus globulus Labill Y Eucalyptus nitens H. Deane & Maiden (MYRTACEAE) PARA EL CONTROL DE Sitophilus zeamais Motschulsky. Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción.*
- <sup>12</sup>Guarnizo, F. A., & Yepes, P. N. (2013). *Experimentos de Química Orgánica con énfasis en ciencias de la vida. Quindío, Colombia: Elizcom.*
- <sup>13</sup>Hurtado, P., & Villa, A. L. (2016). *Estudio de mercado de aceite esencial de naranja en Colombia en el periodo 2009-2014. REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS, 301-310.*

- <sup>14</sup>Martínez, M. E., & López, E. G. (2008). INVESTIGACIÓN DE ADULTERACIONES Y/O FALSIFICACIONES EN PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DE *Cymbopogon citratus* (ZACATE LIMÓN), *Tilia platyphyllos* (TILO), *Morinda citrifolia* (NONI), *Mentha piperita* (MENTA), *Medicago sativa* (ALFALFA), RECOLECTADAS. universidad de el salvador.
- <sup>15</sup>Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Facultad de CC. Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo,.
- <sup>16</sup>Muñoz, O., Montes, M., & Wilkomirsky, t. (2004). Plantas medicinales de uso en Chile (Química y farmacología). San Miguel, Santiago de Chile: Colección Textos Universitarios.
- <sup>17</sup>Naranjo, M. S., Cubiles, L. M., & Campos, M. S. (2006). Actividad antiparasitaria de una decocción de *mentha piperita* Linn. revista Cubana de Medicina Militar.
- <sup>18</sup>O. Santana, et.,al. (2012). Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agro-industrial en Castilla-La Mancha (España). GRASAS Y ACEITES , 214-222.
- <sup>19</sup>Olaya Florez Julia Maria, M. A. (2005). Guía de plantas y productos medicinales. Bogotá: Convenio Andrés Bello.
- <sup>20</sup>Peñalver, D. H., López, B. D., & Ruíz, O. S. (2013). Cultivo de lavanda: calidad y rendimientos del aceite esencial. Centro Agrario de Albaladejito.
- <sup>21</sup>Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Gonçalves M. J., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., Ana Palmeira A., Rodrigues A. and Martinez-de-Oliveira J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1367–1373. DOI 10.1099/jmm.0.46443-0
- <sup>22</sup>Rivera, P. N. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. LA GRANJA, Revista de Ciencias de la vida , 10 (2), 3-15.
- <sup>23</sup>Rodas C. M. A. (2012). Análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor. Tesis Lic. Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ingeniería: Departamento de Ingeniería Química. Guatemala.
- <sup>24</sup>Rueda, L. M., & D., P. P. (2007). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, 3-8.
- <sup>25</sup>Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. (2008). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621–632. Doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.031.
- <sup>26</sup>Salazar, I. C., & Alzate, C. C. (2011). Evaluacion del proceso integral para la obtencion de aceite esencial y pectina a partir de la cáscara de naranja. *Ingenieria y Ciencia* , 65-86.
- <sup>27</sup>Varela, J. A. (2014). EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LA CÁSCARA DEL LIMÓN PERSA. México: INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

<sup>28</sup>Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2016). PROPUESTA PARA SELECCIONAR ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS DE COLOMBIA PARA INVESTIGACIÓN CON BASE EN SU CITOTOXICIDAD. *Vitae*, 23 (1), 18-29.



## ANEXOS

### Anexo 1.- Métodos de obtención de aceites esenciales

#### A.- Hidrodestilación (HD)

En la hidrodestilación, el material vegetal se sumerge en el agua. La HD consiste en llevar a estado de ebullición el agua, que penetra los tejidos de la planta y disuelve una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras; esta disolución acuosa, se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie. Este proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta, de tal manera, que los vapores generados puedan ser condensados y colectados (Figura 1).<sup>(27)</sup>

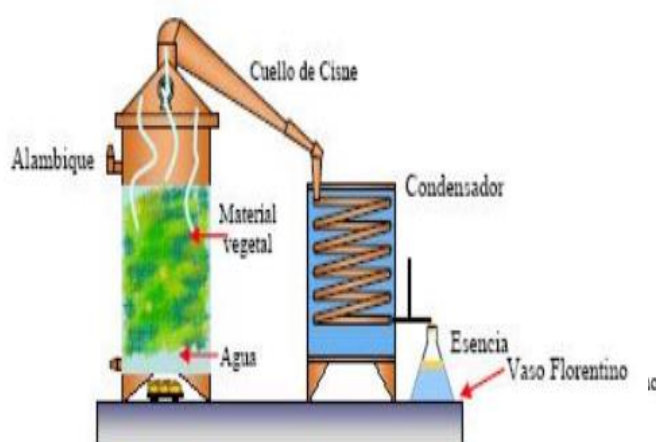
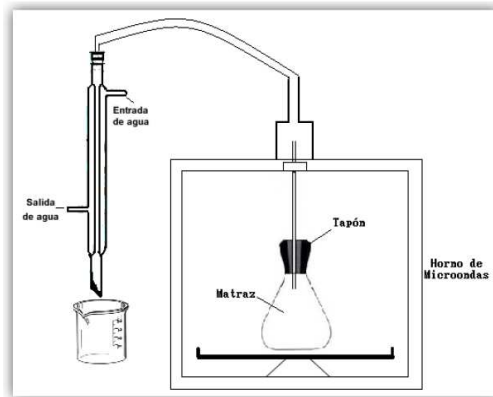


Figura 1.- Aparato para la hidrodestilación

#### B. Hidrodestilación asistida por microondas

En ésta, el material vegetal se sumerge al agua (aproximadamente una tercera parte del material) en un equipo de destilación tipo Clevenger (Figura 2), y se somete a la acción de la radiación de microondas. El agua se calienta hasta ebullición, se producen vapores que atraviesan las estructuras celulares y permiten la evaporización del aceite esencial contenido en ellas. Luego, el aceite arrastrado por el vapor de agua, se condensa y se colecta. Los aceites esenciales se encuentran libres de los productos de combustión y de otros contaminantes, por tal razón, este método favorece especialmente la obtención de las esencias de interés en la perfumería. La principal ventaja de esta técnica es su velocidad, pues pueden lograrse extracciones en minutos, cuando comparativamente una técnica tradicional como la hidrodestilación necesita varias horas.<sup>(23)</sup>



**Figura 2.- Aparato para extracción por hidroddestilación por microondas.**

Entre las ventajas del uso de las microondas para realizar extracciones se tiene:

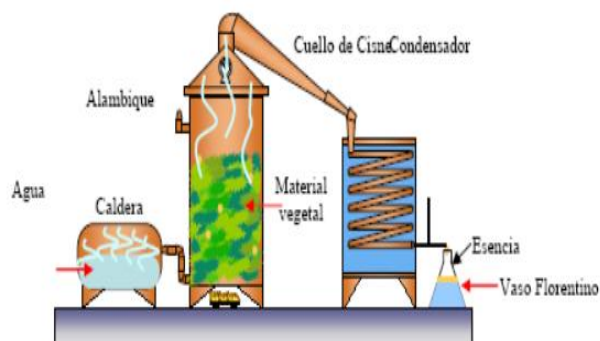
- a) Técnica rápida.
- b) Bajo consumo de disolventes.
- c) Control de todos los parámetros de extracción.
- d) Agitación y extracción de modo simultáneo.
- e) Se logran altas temperaturas y presiones.
- f) No requieren agentes deshidratantes para tratar la muestra (diferencia con Soxhlet).
- g) Procesado de varias muestras. <sup>(12)</sup>

Entre los inconvenientes del uso de las microondas están:

- a) Los extractos necesitan filtrado posterior.
- b) Coste elevado del equipo. <sup>(12)</sup>

### **C. Destilación por arrastre de vapor**

Es el método más usado a nivel industrial, permite obtener aceites esenciales con buenos rendimientos, y, además, se pueden procesar grandes cantidades de material vegetal. Este método es una destilación de la mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceites y, finalmente, se separan en un vaso Florentino (Figura 3). <sup>(23)</sup>

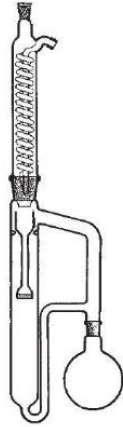


**Figura 3.- Destilación por arrastre de vapor**

#### **D. Extracción con disolventes volátiles**

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras obteniéndose al final una oleorresina o extracto impuro. <sup>(21)</sup>

Algunos disolventes utilizados en este método de extracción tienen restricciones en cuanto a los residuos máximos que pueden dejarse cuando aceites esenciales son la materia prima en las industrias de los perfumes o alimentos. Estos límites varían de acuerdo a las diferentes legislaciones. Los disolventes derivados del petróleo, como el éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de metilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlos y al contacto con la piel y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos. Los extractos obtenidos con este tipo de disolvente son más oscuros ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos, su solubilidad en alcohol diluido es menor y se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. El disolvente con aceite esencial se filtra y se evapora a presión atmosférica y/o vacío. Los restos de solvente se recuperan a temperatura baja. En este tipo de procedimientos se obtienen masas viscosas, según la materia prima, que contienen el aceite esencial, grandes cantidades de ceras, resinas y pigmentos, que se eliminan realizando extracciones con alcohol, enfriando a 13°C, filtrando y evaporando el alcohol. <sup>(21)</sup>



**Figura 4.- Modelo de extractor por disolventes**

Los métodos más usados a nivel laboratorio son extracción por reflujo y mediante equipo Soxlet (Figura 4). Otro tipo de extracción por disolventes mayormente usada a nivel laboratorio, es la maceración o extracción alcohólica, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol, por periodos de tiempo definidos. Los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol, generalmente en rotavapores.<sup>(25)</sup>

El factor más importante es la selección del disolvente. El disolvente debe:

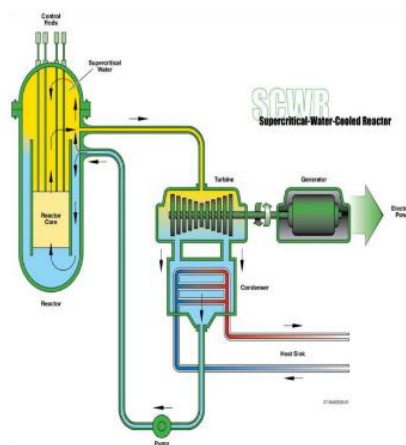
- I. Ser selectivo, esto es disolver rápida y totalmente los componentes odoríferos, con solo una parte mínima de materia inerte
- II. Tener un bajo punto de ebullición.
- III. Ser químicamente inerte al aceite.
- IV. Evaporarse completamente sin dejar cualquier residuo odorífero.
- V. Ser de bajo precio y no inflamable.<sup>(4)</sup>

### **E. Enflorado**

El material vegetal (generalmente flores) se pone en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (el concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.<sup>(6)</sup>

### **F. Extracción por fluidos supercríticos**

Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo, CO<sub>2</sub>) (Figura 5). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas mientras que el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Este procedimiento presenta varias ventajas: alto rendimiento, fácil eliminación del solvente (que además se puede reciclar), no se alteran las propiedades químicas de la esencia por las bajas temperaturas utilizadas para su extracción. Sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.<sup>(1)</sup>



**Figura 5.- Modelo de extractor de fluidos supercríticos**

### **G. Expresión o prensado**

El material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para la extracción de esencias cítricas.<sup>(1)</sup>

Los fenómenos que ocurren durante la extracción del aceite se clasifican en varias etapas:

1. Laceración de la epidermis y de las células que contienen la esencia.
2. Generación en la cáscara de áreas con presión mayor que sus circundantes a través de las cuales el aceite fluye al exterior.
3. Abrasión de la cáscara, con la formación de pequeñas partículas de la raspadura.

La extracción del aceite se realiza sobre la fruta entera o sobre la cáscara y en ambos procesos se puede realizar con un proceso manual o mecánico.<sup>(23)</sup>

### **H. Centrifugado tipo "A"**

**Definición.** Aceite esencial producido por centrifugación de la emulsión jugo-aceite obtenida por expresión en prensa de tornillo de los frutos enteros de *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae.<sup>(8)</sup>

**Descripción.** Líquido claro de ámbar a verde claro. Puede presentar un precipitado ceroso. Olor característico fresco, frutal de tipo cítrico.<sup>(8)</sup>

**Ensayo de identidad. MGA 0241. Gases.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. Los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra, son similares a los tiempos de retención de los picos característicos indicados en la tabla.<sup>(8)</sup>

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.872 y 0.881.<sup>(8)</sup>

**Rotación óptica. MGA 0771.** Entre +35° y +41°.<sup>(8)</sup>

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.4820 y 1.4860.<sup>(8)</sup>

**Determinación de compuestos carbonílicos. MGA-FH 0250.** Entre 4.0 y 6.0 por ciento.<sup>(8)</sup>

**Residuo de la evaporación. MGA 0411.** Entre 10.0 y 14.5 por ciento.<sup>(8)</sup>

**Perfil cromatográfico. MGA 0241. Gases.** Usar el procedimiento de normalización.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** El aceite a examinar.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre: helio, velocidad frontal del gas acarreador 34 cm/min, detector de ionización de flama; columna de sílice fundido de 30 m x 0.32 mm, recubierta con fenilmetilsiloxano (1.0 µm). Temperatura de la columna a 75°C durante 8 min, aumentar la temperatura en incrementos de 4°C/min hasta 200°C, mantener la temperatura durante 255 min; temperatura del detector y del inyector a 270°C.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 0.5 µL de la preparación de la muestra. Los componentes eluyen en el orden indicado en la tabla, dependiendo de las condiciones de operación y el estado de la columna. Registrar los tiempos de retención. Calcular el porcentaje de cada uno de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización, usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos<sup>(8)</sup>:

**Tabla 10.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de limón por Centrifugado tipo "A"**

Compuesto	Intervalo
$\alpha$ -Pino	Entre 2.24 por ciento y 2.55 por ciento
Sabineno	Entre 2.53 por ciento y 3.65 por ciento
$\beta$ -Pino	Entre 19.0 por ciento y 21.10 por ciento
Mirceno	Entre 1.25 por ciento y 1.46 por ciento
d-Limoneno	Entre 46.53 por ciento y 49.06 por ciento
$\gamma$ -Terpineno	Entre 6.71 por ciento y 9.50 por ciento
Linalol	Entre 0.16 por ciento y 0.24 por ciento
$\alpha$ -Terpineol	Entre 0.18 por ciento y 0.34 por ciento
Neral	Entre 1.06 por ciento y 0.84 por ciento
Geranial	Entre 1.68 por ciento y 2.29 por ciento
Trans, trans- $\alpha$ -farneseno	Entre 1.11 por ciento y 1.63 por ciento
$\beta$ -Bisaboleno	Entre 1.64 por ciento y 2.02 por ciento
Germacreno B	Entre 0.23 por ciento y 0.36 por ciento

Tomado de: **Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013.**

(8)

**Conservación.** En envases herméticos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.(8)

### I. Centrifugado tipo “B”

**Definición.** Aceite esencial producido por centrifugación de la emulsión agua-aceite obtenida con un extractor provisto de puntas que pinchen o raspen bajo una aspersión de agua de la superficie del fruto *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae.(8)

**Descripción.** Líquido claro de ámbar oscuro a verde oscuro. Puede presentar precipitado ceroso. Olor característico fresco, frutal de tipo cítrico, parecido a la cáscara de limón.(8)

**Ensayo de identidad. MGA 0241. Gases.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. Los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra, son similares a los tiempos de retención de los picos característicos indicados en la tabla.(8)

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.874 y 0.883.(8)

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.4845 y 1.4885.(8)

**Determinación de los compuestos carbonílicos. MGA-FH 0250.** Entre 4.5 y 9.5 por ciento.(8)

**Residuo de la evaporación. MGA 0411.** Entre 13.0 y 19.0 por ciento.(8)

**Perfil cromatográfico. MGA 0241.Gases.** Usar el procedimiento de normalización.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** El aceite a examinar.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre helio, velocidad frontal del gas acarreador 34 cm/min, detector de ionización de flama; columna de sílice fundido de 30 m x 0.32 mm, recubierta con fenilmetilsiloxano (1.0 µm). Temperatura de la columna a 75°C durante 8 min, aumentar la temperatura en incrementos de 4°C/min hasta 200°C, mantener la temperatura durante 255 min; temperatura del detector y del inyector a 270°C.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 0.5 µL de la preparación de la muestra. Los componentes eluyen en el orden indicado en la tabla, dependiendo de las condiciones de operación y el estado de la columna. Registrar los tiempos de retención. Calcular el porcentaje de cada uno de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización, usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos<sup>(8)</sup>:

**Tabla 11.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de limón por Centrifugado tipo “B”**

Compuesto	Intervalo
<b>α-Pineno</b>	Entre 1.59 por ciento y 2.53 por ciento
<b>Sabineno</b>	Entre 2.79 por ciento y 3.59 por ciento
<b>β-Pineno</b>	Entre 16.72 por ciento y 21.69 por ciento
<b>Mirceno</b>	Entre 1.11 por ciento y 1.35 por ciento
<b>d-Limoneno</b>	Entre 45.08 por ciento y 49.82 por ciento
<b>γ-Terpineno</b>	Entre 7.55 por ciento y 9.40 por ciento
<b>Linalol</b>	Entre 0.11 por ciento y 0.29 por ciento
<b>α-Terpineol</b>	Entre 0.22 por ciento y 0.48 por ciento
<b>Neral</b>	Entre 1.57 por ciento y 2.30 por ciento
<b>Geranial</b>	Entre 2.35 por ciento y 3.79 por ciento
<b>Trans, trans-α-farneseno</b>	Entre 1.43 por ciento y 1.90 por ciento
<b>β-Bisaboleno</b>	Entre 1.52 por ciento y 2.22 por ciento

**Tomado de: Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013.<sup>(8)</sup>**

**Conservación.** En envases herméticos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.<sup>(8)</sup>

## **J. Destilado**



**Definición.** Aceite esencial obtenido del pericarpio fresco e inmaduro de *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae.<sup>(8)</sup>

**Descripción.** Líquido cristalino, color amarillo claro. Olor característico fresco, frutal de tipo cítrico.<sup>(8)</sup>

**Ensayo de identidad. MGA 0241. Gases.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. Los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra, son similares a los tiempos de retención de los picos característicos indicados en la tabla.<sup>(8)</sup>

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.855 y 0.863.<sup>(8)</sup>

**Rotación óptica. MGA 0771.** Entre +34° y +45°.<sup>(8)</sup>

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.4745 y 1.4770.<sup>(8)</sup>

**Determinación de compuestos carbonílicos. MGA-FH 0250.** Entre 0.1 y 1.5 por ciento.<sup>(8)</sup>

**Residuo de la evaporación. MGA 0411.** Entre 0.2 y 2.2 por ciento.<sup>(8)</sup>

**Perfil cromatográfico. MGA 0241. Cromatografía de gases.** Usar el procedimiento de normalización.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** El aceite a examinar.<sup>(8)</sup>

**Condiciones del equipo.** Gas de arrastre: helio, velocidad frontal del gas acarreador 34 cm/min, detector de ionización de flama; columna de sílice fundido de 30m x 0.32 mm, recubierta de fenilmetilsiloxano (1.0 µm). Temperatura de la columna a 75°C durante 8 min, aumentar la temperatura en incrementos de 4°C/min hasta 200°C, mantener la temperatura durante 255 min; temperatura del detector y del inyector a 270°C.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 0.5 µL de la preparación de la muestra. Los componentes eluyen en el orden indicado en la tabla, dependiendo de las condiciones de operación y el estado de la columna. Registrar los tiempos de retención. Calcular el porcentaje de cada uno de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización, usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos<sup>(8)</sup>:

**Tabla 12.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de limón por Destilado.**

Compuesto	Intervalo
$\alpha$ -Pineno	Entre 0.98 por ciento y 1.40 por ciento
$\beta$ -Pineno	Entre 1.18 por ciento y 2.65 por ciento
Mirceno	Entre 1.29 por ciento y 1.41 por ciento
1,4-Cineol	Entre 1.67 por ciento y 2.55 por ciento
$\alpha$ -terpineno	Entre 2.18 por ciento y 3.04 por ciento
d-Limoneno	Entre 45.44 por ciento y 47.23 por ciento
1,8-Cineol	Entre 1.00 por ciento y 2.50 por ciento
$\gamma$ -Terpineno	Entre 10.10 por ciento y 11.79 por ciento
Terpinoleno	Entre 6.90 por ciento y 8.52 por ciento
Linalool	Entre 0.12 por ciento y 0.21 por ciento
$\alpha$ -Fenchol	Entre 0.75 por ciento y 0.93 por ciento
Terpinen-1-ol	Entre 0.72 por ciento y 1.15 por ciento
$\beta$ -Terpineol	Entre 0.56 por ciento y 0.78 por ciento
Borneol	Entre 0.43 por ciento y 0.57 por ciento
Terpinen-4-ol	Entre 0.76 por ciento y 1.06 por ciento
$\alpha$ -Terpineol	Entre 6.20 por ciento y 7.20 por ciento
$\gamma$ -Terpineol	Entre 0.80 por ciento y 1.19 por ciento
Geranial	Entre 0.01 por ciento y 0.08 por ciento
<i>Trans,trans</i> - $\alpha$ -farneseno	Entre 0.71 por ciento y 1.19 por ciento
$\beta$ -bisaboleno	Entre 1.05 por ciento y 1.64 por ciento

Tomado de: Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013.<sup>(8)</sup>

**Conservación.** En envases herméticos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.<sup>(8)</sup>

## K. Destilado y desterpenado

**Definición.** Aceite esencial obtenido por destilación del aceite de *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae. Procesado en un equipo de alta eficiencia de fraccionamiento al vacío, en condiciones de baja temperatura, posterior extracción de los terpenos volátiles y concentración de los componentes oxigenados y sesquiterpenos.<sup>(8)</sup>

**Descripción.** Líquido claro, color amarillo, Olor característico fresco, frutal de tipo cítrico.<sup>(8)</sup>

**Ensayo de identidad. MGA 0241. Gases.** Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de perfil cromatográfico. Los tiempos de retención de los picos característicos en el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra, son similares a los tiempos de retención de los picos característicos indicados en la tabla.<sup>(8)</sup>

**Densidad relativa. MGA 0251.** Entre 0.906 y 0.912.<sup>(8)</sup>

**Rotación óptica. MGA 0771.** Entre -11.0° y -5.0°. <sup>(8)</sup>

**Índice de refracción. MGA 0741.** Entre 1.4848 y 1.4864. <sup>(8)</sup>

**Determinación de compuestos carbonílicos. MGA-FH 0250.** Entre 1.8 y 3.1 por ciento. <sup>(8)</sup>

**Residuo de la evaporación. MGA 0411.** Entre 0.2 y 2.2 por ciento. <sup>(8)</sup>

**Perfil cromatográfico. MGA 0241.** Gases. Usar el procedimiento de normalización. <sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** El aceite a examinar. <sup>(8)</sup>

**Condiciones de equipo.** Gas de arrastre: helio, velocidad frontal del gas acarreador 34 cm/min, detector de ionización de flama; columna de sílice fundido de 30 m x 0.32 mm, recubierta con fenilmetilsiloxano (1.0  $\mu$ m). Temperatura de la columna a 75°C durante 8 min, aumentar la temperatura en incrementos de 4°C/min hasta 200°C, mantener la temperatura durante 255 min; temperatura del detector y del inyector a 270°C. <sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Inyectar 0.5  $\mu$ L de la preparación de la muestra. Los componentes eluyen en el orden indicado en la tabla, dependiendo de las condiciones de operación y el estado de la columna, Registrar los tiempos de retención. Calcular el porcentaje de cada uno de los siguientes componentes por el procedimiento de normalización, usando el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra. Los porcentajes están dentro de los siguientes intervalos <sup>(8)</sup>:

**Tabla 13.- Intervalos de porcentajes de los compuestos del aceite esencial de limón por Destilado y desterpenado**

Compuesto	Intervalo
$\alpha$ -Pino	Entre 0.00 por ciento y 0.04 por ciento
$\beta$ -Pino	Entre 0.00 por ciento y 0.04 por ciento
1,4-Cineol	Entre 0.00 por ciento y 0.04 por ciento
d-Limoneno	Entre 0.27 por ciento y 1.05 por ciento
$\gamma$ -Terpino	Entre 0.32 por ciento y 0.65 por ciento
Terpinoleno	Entre 0.75 por ciento y 1.30 por ciento
Linalol	Entre 0.35 por ciento y 0.75 por ciento
$\alpha$ -Fencho	Entre 0.95 por ciento y 2.66 por ciento
Terpínen-1-ol	Entre 2.46 por ciento y 4.83 por ciento
$\beta$ -Terpineol	Entre 2.99 por ciento y 3.71 por ciento
Borneol	Entre 2.10 por ciento y 3.14 por ciento
Terpínen-4-ol	Entre 4.11 por ciento y 5.55 por ciento
$\alpha$ -Terpineol	Entre 34.43 por ciento y 38.69 por ciento
$\gamma$ -Terpineol	Entre 5.07 por ciento y 6.77 por ciento

<b>Geranial</b>	Entre 0.13 por ciento y 0.32 por ciento
<b>Trans-<math>\alpha</math>-bergamoteno</b>	Entre 3.55 por ciento y 4.92 por ciento
<b>Trans,trans-<math>\alpha</math>-farneseno</b>	Entre 3.88 por ciento y 6.45 por ciento
<b><math>\beta</math>-Bisaboleno</b>	Entre 5.20 por ciento y 8.48 por ciento

**Tomado de: Farmacopea Herbolaria de los estados Unidos Mexicanos, 2013<sup>(8)</sup>**

**Conservación.** En envases herméticos, protegidos de la luz, evitar exposición al calor.<sup>(8)</sup>

## Anexo 2.- Métodos Generales de Análisis (MGA)

### MGA 0001.- Determinación del índice de acidez

La acidez de las grasas y mezclas de aceites, puede ser expresada como el número de mililitros de SV de hidróxido de potasio 0.1 M o SV de hidróxido de sodio 0.1M, requeridos para neutralizar los ácidos libres en 10.0 g de la muestra por analizar.<sup>(8)</sup>

La acidez es frecuentemente expresada como índice acidez, es decir, el número de miligramos de hidróxido de potasio, necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres en 1.0 g de la muestra.<sup>(8)</sup>

**Recomendaciones especiales.** Para los casos de aceites turbios debido a la separación de la estearina, calentar el recipiente que contiene la muestra en un baño de agua a 50°C, hasta que el aceite sea claro, si con este tratamiento no clarifica totalmente, filtrar a través de papel filtro seco en un embudo, manteniendo la temperatura. Mezclar cuidadosamente la mezcla antes de pesar.<sup>(8)</sup>

Para los casos de muestras que pueden solidificarse a temperatura ambiente, deben ser previamente fundidas y pesarse, cuidando que no solidifiquen durante este proceso.<sup>(8)</sup>

Para aceites que hayan sido conservados mediante saturación con dióxido de carbono, se deben someter a alguno de los siguientes tratamientos<sup>(8)</sup>:

Mantener la muestra en un desecador al vacío durante 24 h, antes de pesar la muestra, o bien si la muestra no se disuelve en el disolvente frío, antes de la valoración agregar a la muestra una mezcla de alcohol: éter dietílico (1:1) neutralizada con SV de hidróxido de potasio 0.1 M o SV de hidróxido de sodio 0.1 M, usando 0.5 mL de SI de fenolftaleína y mantener a reflujo suave durante 10 min, agitando con frecuencia hasta que la muestra se disuelva.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** A menos que la monografía correspondiente indique lo contrario, proceder de la siguiente manera<sup>(8)</sup>:

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón esmerilado, disolver 10.0 g de la muestra en 50 mL de una mezcla de alcohol: éter dietílico (1:1), neutralizada con SV de hidróxido de potasio 0.1 M usando Si de fenolftaleína, agitar, agregar 1.0 mL de fenolftaleína y titular con SV de hidróxido de potasio 0.1 M o SV de hidróxido de sodio 0.1 M, hasta que un color rosa persista por lo menos durante 15 s.<sup>(8)</sup>

**Cálculos:** Calcular el índice de acidez por medio de la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$I = 5.61 V/m$$

**Dónde:**

I= Índice de acidez de la muestra

5.61= Miliequivalente de la SV de hidróxido de potasio 0.1 M.

V= Mililitros de SV de hidróxido de potasio 0.1 M, usados en la valoración.

M= Peso en gramos de la muestra tomada.

#### **MGA 0411.- Residuo de la evaporación**

El residuo de la evaporación es la masa del residuo, después de evaporar y secar un medicamento.<sup>(8)</sup>

#### **Sustancias líquidas y sólidas (exceptuando extractos fluidos y tinturas)**

A menos que se indique otra cosa, evaporar en baño de agua la cantidad indicada en la monografía respectiva de la sustancia problema (pesada o medida exactamente) en un pesafiltros con tapón esmerilado o cápsula de porcelana, puestos previamente a masa constante a 105°C, secar en la estufa a 105°C hasta masa constante, enfriar en un desecador, aplicar vacío si así lo indica la monografía respectiva y pesar.<sup>(8)</sup>

#### **Extractos fluidos y tinturas.**

Pesar exactamente alrededor de 2 g de extracto fluido o 5 g de tintura, en un pesafiltros con tapón esmerilado o cápsula de porcelana puesta previamente a peso constante a 105°C; evaporar en un baño de agua, agitar suavemente y frecuentemente hasta obtener una consistencia similar a un jarabe. Secar en la estufa a 105°C durante 2 h, enfriar en desecador, aplicar vacío si la monografía específica lo requiere y pesar.<sup>(8)</sup>

**Cálculos.** Calcular el porcentaje del residuo de la evaporación, con la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$\text{Por ciento del residuo} = (A/M)100$$

**Dónde:**

A= Peso del residuo (peso del pesafiltros o cápsula con el residuo seco, menos la masa del mismo recipiente vacío).

M= Volumen o peso de la muestra.

#### **MGA 0411.- Residuo de la evaporación**

El residuo de la evaporación es la masa del residuo, después de evaporar y secar un medicamento.<sup>(8)</sup>

#### **Sustancias líquidas y sólidas (exceptuando extractos fluidos y tinturas)**

A menos que se indique otra cosa, evaporar en baño de agua la cantidad indicada en la monografía respectiva de la sustancia problema (pesada o medida exactamente) en un pesafiltros con tapón esmerilado o cápsula de porcelana, puestos previamente a masa constante a 105°C, secar en la estufa a 105°C hasta masa constante, enfriar en un desecador, aplicar vacío si así lo indica la monografía respectiva y pesar.<sup>(8)</sup>

#### **Extractos fluidos y tinturas.**

Pesar exactamente alrededor de 2 g de extracto fluido o 5 g de tintura, en un pesafiltros con tapón esmerilado o cápsula de porcelana puesta previamente a peso constante a 105°C; evaporar en un baño de agua, agitar suavemente y frecuentemente hasta obtener una consistencia similar a un jarabe. Secar en la estufa a 105°C durante 2 h, enfriar en desecador, aplicar vacío si la monografía específica lo requiere y pesar.<sup>(8)</sup>

**Cálculos.** Calcular el porcentaje del residuo de la evaporación, con la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$\text{Por ciento del residuo} = (A/M)100$$

**Dónde:**

A= Peso del residuo (peso del pesafiltros o cápsula con el residuo seco, menos la masa del mismo recipiente vacío).

M= Volumen o peso de la muestra.

## MGA 0741.- Índice de refracción

El índice de refracción de una sustancia está basado en la relación que existe entre la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en la sustancia que se analiza. Se define también como la relación entre el seno del ángulo incidente formado por la incidencia de un rayo de luz en una sustancia dada, entre el seno del ángulo de refracción formado por el mismo rayo refractado dentro de esa sustancia.<sup>(8)</sup>

El aparato está calibrado adecuadamente. La temperatura a la que se realiza la determinación se ajustará debidamente y se conservará durante el tiempo que requiere la prueba ya que el índice de refracción varía significativamente con la temperatura, los valores del índice de refracción dados en esta Farmacopea son para la línea D de sodio (uniforme a 589.0 nm y 589.6 nm). Y la temperatura es de  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ , a menos que la monografía especifique otra temperatura.<sup>(8)</sup>

Para obtener el índice de refracción, se emplea un refractómetro que puede ser de Abbe, u otros refractómetros de igual o mayor exactitud. Para alcanzar la exactitud técnica de  $\pm 0.0001$ , es necesario calibrar el instrumento con un patrón de referencia para verificar el control de temperatura y la limpieza del mismo. La calibración se puede realizar con las sustancias siguientes (Tabla 14) y de acuerdo al manual de operación del aparato utilizado.<sup>(8)</sup>

**Tabla 14.- Sustancias con las cuales puede realizarse la calibración del refractómetro.**

Líquido de refracción	$n_{D_{20}}$	Temperatura
Agua destilada	1.3330	20°C
Agua destilada	1.3325	25°C
Monobromonaftaleno	1.6580	20°C

**Procedimiento.** Preparar la muestra como se indica en la monografía correspondiente. Ajustar la temperatura del aparato y de la muestra según se requiera, depositar una gota sobre la superficie del prisma de medición, evitar que se formen burbujas cerrar y obtener un mínimo de tres lecturas por muestra, calcular el promedio.<sup>(8)</sup>

El promedio obtenido está comprendido dentro de los límites especificados en la monografía correspondiente (la diferencia entre cada lectura no es mayor de 0.0002).<sup>(8)</sup>

## MGA 0771.- Rotación óptica

Muchas sustancias de uso farmacéutico en estado puro o es solución son ópticamente activas, es decir, sus moléculas poseen la propiedad de rotar o desviar el plano de luz polarizada que incide sobre ellas, formando un ángulo mensurable con el plano de la luz incidente. Cuando este fenómeno es muy definido, se puede medir con suficiente precisión y aprovechar como base algunas valoraciones, así como para ensayos de identidad. La rotación óptica se expresa en grados, ya sea como rotación angular (observada) o como rotación específica (calculada con referencia a la concentración específica de 1.0 g de soluto en 1.0 mL de solución y medida bajo condiciones de 1.0 dm a una longitud de 589 nm y a 25°C).<sup>(8)</sup>

Las sustancias ópticamente activas, son dextrorrotatorias o dextrógiras si se desvían el plano de luz polarizada hacia la derecha, y se designan (+) o (D), y son levorrotatorias o levógiras si lo desvían hacia la izquierda, y se designan (-) o (L).<sup>(8)</sup>

La rotación específica se expresa, generalmente, mediante el término  $(\alpha)_x^t$  en el que t es la temperatura en grados centígrados, a la que se efectúa la determinación y x representa la línea espectral característica o longitud de onda de luz empleada. A menos que se indique otra cosa en la monografía respectiva, los valores citados en esta Farmacopea se han determinado a 25°C utilizando la línea D del espectro de sodio, por pareja, y a 589.0 nm y 589.6 nm El poder rotatorio varía apreciablemente con la temperatura, por lo que ésta debe mantenerse exacta durante la determinación.<sup>(8)</sup>

**Medición fotoeléctrica.** Usar el polarímetro fotoeléctrico que tenga una exactitud aproximada de  $\pm 0.2$  por ciento. Para obtener precisión y exactitud en la medición, el aparato estará en buenas condiciones, con sus elementos ópticos muy limpios y exactamente alineados y estar ajustado a cero. La fuente de la luz adecuada será regulada y alineada respecto al sistema óptico. El aparato estará provisto de un sistema de filtros que permita el paso de la luz monocromática. Los polarímetros de precisión tienen discos intercambiables que aíslan la línea D de la luz de sodio o la línea 546.1 nm del espectro de mercurio. En otros tipos de polarímetro se emplea celdillas llenas de líquidos coloreados como filtros. Las observaciones serán precisas, de tal manera que, al reproducirlas, la diferencia entre los valores observados o calculados ya sea como rotación específica o como rotación angular, no sea mayor de una cuarta parte de las variaciones establecidas en la monografía respectiva. Para los fines farmacopeicos es conveniente emplear un polarímetro en el que se pueda leer, con precisión, una rotación angular variable hasta en 0.05°, o en algunos casos, hasta en 0.01° o menos.<sup>(8)</sup>

Los tubos del polarímetro se llenan evitando la formación y desprendimiento de burbujas de aire, que interfieren el paso del rayo de luz. La interferencia es mínima cuando se emplean tubos con la boca hacia un lado. Con los que tienen la boca



uniforme, como, los micros y semi-micro, se procede con cuidado al llenarlos. Los tubos se pueden cerrar con empaques o tapas, que se aprietan lo suficiente para asegurar un sello a prueba de goteo. La presión excesiva puede resultar perjudicial para la medición. Cuando la rotación específica se determina en sustancias de bajo poder rotatorio, es conveniente aflojar la tapa y apretarla otra vez, entre lecturas sucesivas de la medición de la rotación y el ajuste del aparato a cero. Las diferencias originadas por la tensión en los empaques, generalmente se advierten en seguida y se hacen los ajustes necesarios, para eliminar la causa que las produce.<sup>(8)</sup>

**Calibración del aparato.** El aparato puede ser calibrado con la ayuda de una solución de sacarosa previamente secada. Las lecturas son tomadas utilizando un tubo de 2 dm. La tabla 15 muestra la relación entre concentración, temperatura y rotación angular.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Cuando la sustancia es un líquido, ajustar su temperatura a 25°C, pasarla al tubo del polarímetro y se procede como se indica más adelante, desde donde dice: “...Efectuar, cuando menos, cinco lecturas...”. La prueba en blanco se verídica empleando un tubo seco y vacío. Cuando la sustancia es un sólido, pesar una porción adecuada, depositarla en un matraz volumétrico con la ayuda de agua, o de otro disolvente especificado, reservando una porción adecuada del disolvente para la prueba en blanco. Agregar más disolvente hasta cerca de la línea de aforo y ajustar la temperatura del contenido del matraz a 25°C, sumergiendo el matraz en un baño de agua a temperatura constante. Agregar disolvente hasta el aforo y mezclar. La solución se pasa al tubo del polarímetro, dentro del término de 30 min a partir del momento de disolución total de la muestra, teniendo cuidado el tiempo transcurrido cuando se trata de sustancias que se sabe experimentan racemización o mutarotación. Durante el intervalo transcurrido, la solución se mantiene a la temperatura de 25°C.<sup>(8)</sup>

Efectuar, cuando menos, cinco lecturas de rotación observada a 25°C. Sustituir el tubo que contiene la solución de la muestra, por el que contiene el disolvente y efectuar con éste, un número igual de lecturas. Para obtener la rotación observada corregida, ajustar el aparato a cero, promediar las lecturas de la prueba en blanco y sustraer de este el promedio de las lecturas de rotación observada, si las dos cifras son del mismo signo, o agregarlo si las cifras tienen signo opuesto.<sup>(8)</sup>

**Tabla 15.- Rotación angular dependiendo de la temperatura.**

Concentración g/100 mL	15°C	20°C	25°C	30°C
10.0	13.35	13.34	13.33	13.31
20.0	26.67	26.64	26.61	26.58
30.0	39.94	39.90	39.86	39.82

<b>40.0</b>	53.18	53.12	53.06	53.01
<b>50.0</b>	66.37	66.30	66.23	66.16

**Cálculos.** Calcular la rotación específica de una sustancia líquida o sólida en solución, con las siguientes fórmulas<sup>(8)</sup>:

**Para sustancias líquidas:**

$$(\alpha)_x^t = \frac{a}{ld}$$

**Para sustancias sólidas en solución:**

$$(\alpha_x^t) = \frac{100 a}{lmd} = \frac{100 a}{lc}$$

**Dónde:**

a= Rotación observada corregida, en grados, a la temperatura t, a la longitud de onda x.

l= Longitud del tubo del polarímetro en decímetros.

d= Densidad del líquido o de la solución, a la temperatura de la observación.

m= Concentración de la solución expresada en gramos por cada 100 g de solución.

c= Concentración de la solución expresada en gramos de la sustancia por cada 100 mL de la solución.

### **MGA-FH 0050.- Cromatografía en capa delgada**

La cromatografía en capa delgada es una técnica particularmente valiosa para la determinación cualitativa de pequeñas cantidades de compuestos o impurezas. Esta técnica es fácil de realizar, es efectiva y requiere de equipo poco costoso; por lo tanto es utilizado frecuentemente para la evaluación de plantas medicinales y de sus preparaciones.<sup>(8)</sup>

Los siguientes parámetros deben determinarse con base en las monografías de la farmacopea o establecidas experimentalmente por el análisis de cada material vegetal individual<sup>(8)</sup>:

- a. El tipo de adsorbente y método de activación; si no se menciona, calentar a 110°C durante 30 min.

- b. El método de preparación y concentración de la solución de prueba y la solución de referencia.
- c. El volumen de la solución que se aplicará a la placa.
- d. La fase móvil y distancia de migración.
- e. Las condiciones de secado, la temperatura y el método de detección.
- f. Para los resultados obtenidos observar en las manchas
  - i. -Número y posición aproximada o el valor de  $R_f$  si es necesario.
  - ii. -Fluorescencia y color.
- g. Detección bajo lámpara de luz UV (254 nm o 365 nm) o visible.

### **A. Método clásico**

El método considera el uso de placas para cromatografía preparadas en el laboratorio, pero se pueden utilizar placas precubiertas, activadas si es necesario, siempre que se haya comprobado que son adecuadas para el caso en particular.<sup>(8)</sup>

Debe utilizarse, como material de referencia, un espécimen pulverizado con calidad farmacopieca para identificar y determinar la pureza del material vegetal medicinal. Las preparaciones de la muestra y la de referencia, deben ser realizadas simultáneamente y exactamente de la misma forma.<sup>(8)</sup>

Si se va a determinar la presencia de un principio activo conocido, se puede utilizar la sustancia de referencia correspondiente.<sup>(8)</sup>

Las preparaciones de referencia deben ser de concentración conocida. Si se selecciona la razón cuantitativa de la sustancia activa en la preparación de referencia, de acuerdo con la composición de un material típico, la comparación del tamaño de las manchas proporciona información adicional valiosa. Siempre que sea posible se deberá utilizar el mismo disolvente para las preparaciones de la muestra y de referencia. Se debe indicar el sistema de disolventes en el procedimiento de la prueba, para el material individual a ser examinado. Una mezcla tricolor (por ejemplo, una solución de azul de indofenol al 0.01 por ciento en tolueno, rojo sudán G y amarillo de dimetilo<sup>9</sup> corridos juntos permite un control rápido de las condiciones cromatográficas prevalentes. Si se sospecha que el material a examinar es inestable, la cámara cromatográfica deberá protegerse de la luz. En cualquier caso la cámara cromatográfica debe estar protegida de los rayos solares, ya que los rayos pueden difractarse en diferentes grados debido a las imperfecciones del espesor del vidrio de la cámara y puede elevar la temperatura en la placa cromatográfica y dar como resultado un flujo errático de la fase móvil.<sup>(8)</sup>

**Preparación de la muestra.** Antes de la prueba debe realizarse un proceso rápido de extracción con el material vegetal a ser examinado.<sup>(8)</sup>

Para 0.1 g o 1.0 g de material vegetal pulverizado, adicionar de 1.0 mL a 10.0 mL de disolvente, extraer la muestra por agitación o con movimientos periódicos durante 3 min a 30 min, calentar a ebullición y permitir que se enfríe. El material insoluble se elimina por centrifugación o filtrado a través de un embudo pequeño con papel filtro o con un tapón de algodón. Si es necesario evaporar el disolvente en un baño de agua y restituir el residuo en un menor volumen de disolvente (por ejemplo, de 0.1 mL a 0.2 mL). Si es necesario, purificar la preparación de la muestra repitiendo la extracción con disolventes, utilizando un pH diferente, por sublimación, destilación, etc.<sup>(8)</sup>

**Aparato.** Estará constituido por lo siguiente:

- a. Placas de vidrio de grosor uniforme a lo largo de toda su área, longitud 15 cm a 20 cm y ancho suficiente para acomodar el número de muestras requeridas y las preparaciones de referencia;
- b. Dispositivo para esparcir una capa uniforme de material de recubrimiento de un grosor deseado sobre placas de vidrio;
- c. Estante para sostener las placas preparadas durante el periodo de secado o para la transportación y almacenamiento, normalmente se deben acomodar 10 placas con espacios apropiados y las dimensiones del estante deben permitir colocarlo en una estufa de secado y en un desecador;
- d. Cámara cromatográfica de material transparente, usualmente de vidrio con tapa hermética y de un tamaño adecuado para el acomodo de las placas de prueba;
- e. Aplicador para el reactivo con una boquilla que produzca un rocío fino y fabricado de un material resistente;
- f. La fuente de luz ultravioleta que emita longitudes de onda a 254 nm y 365 nm.

Antes de usar las placas cromatográficas se limpiarán escrupulosamente y se colocarán dentro de un líquido limpiador, enjuagar minuciosamente hasta que el agua resbale de la placa sin dejar marcas visibles de agua o manchas de aceite y posteriormente secar. Las placas deben estar perfectamente libres de pelusa o polvo cuando se aplique el material de recubrimiento.<sup>(8)</sup>

**Preparación del adsorbente.** A menos que otra cosa se indique en el procedimiento de la prueba preparar una lechada del material de recubrimiento en agua, en una solución acuosa, cubrir la placa limpia con una capa homogénea de aproximadamente 0.25 mm de espesor. Secar las placas cubiertas al aire y calentarlas para activarlas a 110°C durante 30 min, posteriormente dejar enfriar. Inspeccionar la uniformidad de la cubierta observándolas contra la luz y la textura de la capa de adsorbente en la luz reflejada. Si las placas no son utilizadas

inmediatamente se almacenarán en un desecador que contiene como descante gel de sílice. Para dar un terminado quitar la orilla (2 mm a 5 mm) del material de recubrimiento de los lados verticales de la placa.<sup>(8)</sup>

Si la capa de revestimiento requiere de ser ácida, alcalina o amortiguadora utilizar ácidos, bases y mezclas de sales diluidas, en lugar de agua para la preparación de la lechada, como se indica en el procedimiento de la muestra. Una solución acuosa de 5.0 g a 7.0 g de carboximetilcelulosa sódica puede reemplazar al agua, si el adsorbente no contiene adherente.<sup>(8)</sup>

**Saturación de la cámara cromatográfica.** A menos que se indique otra cosa en el procedimiento de análisis, la cromatografía se lleva a cabo en una cámara saturada. Para alcanzar la saturación, colocar una tira de papel filtro de modo que se cubra por lo menos la mitad de la superficie total de las paredes internas de la cámara, poner la cantidad suficiente de fase móvil para saturar el papel filtro y para que se forme una capa de este líquido de aproximadamente 5 mm de profundidad. Cerrar la cámara y dejarla a temperatura ambiente por lo menos 1 h.<sup>(8)</sup>

De preferencia, todas las operaciones en las cuales las placas se exponen al aire, deben llevarse a cabo a una humedad relativa de 50 por ciento al 60 por ciento y las placas deben manejarse con cuidado.<sup>(8)</sup>

**Aplicación de las preparaciones de la muestra y de referencia.** Utilizando una micropipeta o una jeringa graduada en microlitros, colocar las preparaciones de la muestra y de referencia en la línea de inicio, la cual deberá ser paralela y aproximadamente 15 mm del extremo inferior de la placa. Las muestras deben estar al menos a 15 mm del extremo de la placa y con una separación de por lo menos 15 mm entre una y otra muestra. Las manchas en los puntos de aplicación deben ser lo más pequeñas posibles, de preferencia no mayores de 4 mm de diámetro; si es necesario aplicar la solución en porciones, secando entre cada aplicación. Marcar la distancia que ascendió la fase móvil, la cual generalmente es de 10 cm a 15 cm de la línea de inicio. Se pueden mejorar los resultados de la separación, aplicando la solución en bandas horizontales de 10 mm a 15 mm de largo y no más de 5 mm de ancho.<sup>(8)</sup>

**Desarrollo de los cromatogramas.** Dejar secar las muestras, colocar la placa lo más vertical posible dentro de la cámara, asegurarse que los puntos de aplicación queden por arriba de la superficie de la fase móvil. Cerrar la cámara permitiendo que se desarrolle la cromatografía a temperatura ambiente, a menos que se indique otra cosa, permitir que el disolvente ascienda hasta la distancia especificada. Secar la placa, marcar el frente del disolvente y permitir que se evapore a temperatura ambiente o como se indique.<sup>(8)</sup>

**Observación e interpretación de los cromatogramas.** En primer lugar, observar las manchas producidas a simple vista, después debajo de una lámpara de luz UV de longitud de onda corta y de longitud de onda larga. Marcar el centro de cada mancha. Medir y registrar la distancia del centro de cada mancha al punto de aplicación, e indicar para cada una de ellas la longitud de onda a la cual se observan.<sup>(8)</sup>

Si se indica en el procedimiento de análisis, rociar la placa con el reactivo especificado, observar y comparar las manchas con los del material de referencia.<sup>(8)</sup>

Si se requiere del cálculo de la proporción de la distancia recorrida por un compuesto dado y la distancia recorrida por el frente del disolvente ( $R_F$ ) o la proporción de la distancia recorrida por un compuesto y aquella recorrida por una sustancia de referencia (valor de  $R_F$ ) utilizando las ecuaciones siguientes<sup>(8)</sup>:

$$RF = \frac{a}{b} \quad RF = \frac{a}{c}$$

**Donde:**

a= la distancia entre el punto de aplicación y el centro de la mancha del material a analizar;

b= la distancia entre el punto de aplicación y el frente del disolvente;

c= la distancia entre el punto de aplicación y el centro de la mancha de la sustancia de referencia.

El  $R_F$  puede variar con cada experimento dependiendo de las condiciones de saturación en la cámara cromatográfica, la actividad de la capa adsorbente y la composición de la fase móvil.<sup>(8)</sup>

## **B: Micrométodo.**

Los cromatogramas se pueden desarrollar tanto vertical como horizontalmente. A menos que se especifique otra cosa en el procedimiento de análisis para el material vegetal determinado, la cromatografía en capa delgada se realiza en placas pequeñas utilizando la técnica ascendente.<sup>(8)</sup>

### **1.- Técnica ascendente**

**Aparato.** El equipo consta de:

- a. Placas prefabricadas o preparadas especialmente de no más de 100 mm de largo y no más de 100 mm de ancho, que permita desarrollar el cromatograma a una distancia mínima de 60 mm;
- b. Micropipetas de 1  $\mu\text{L}$  o 2  $\mu\text{L}$  de capacidad con una precisión de 10.0 por ciento del volumen prescrito;
- c. Una cámara fotográfica con tapa de cierre hermético y base plana. El tamaño de la cámara será el adecuado para acomodar las placas y el volumen de la fase móvil.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Poner la fase móvil, previamente mezclada y homogeneizada, en la cámara cromatográfica en la cantidad suficiente para formar una capa de 5 mm de profundidad (La mezcla de fase móvil deberá desecharse después de correr una placa.) Cerrar la cámara y permitir que alcance la temperatura ambiente evitando las corrientes de aire y los rayos solares, durante 15 min.<sup>(8)</sup>

Utilizar una micropipeta para aplicar las muestras de las soluciones a ser examinadas, las muestras se aplicarán 10 mm arriba del extremo inferior de la placa con una separación entre cada aplicación de 5 mm a 10 mm. Las aplicaciones de las muestras deben ser lo más pequeño posible, preferentemente de no más de 2 mm de diámetro, marcar la distancia recorrida por la fase móvil la cual generalmente es de 60 mm de la línea de inicio.<sup>(8)</sup>

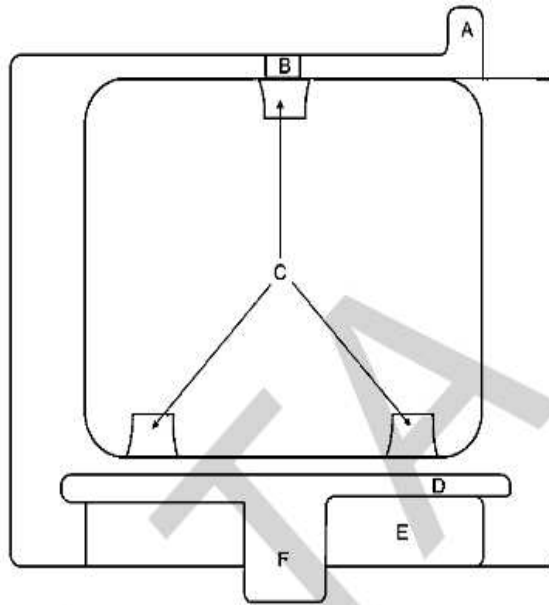
Permitir que se sequen las muestras aplicadas, colocar las placas lo más vertical posible dentro de la cámara asegurándose que los puntos de aplicación estén por arriba de la superficie de la fase móvil. Los lados de las placas no deben de estar en contacto con las paredes de la cámara. Cerrar la cámara, permitir que se desarrolle la cromatografía a temperatura ambiente, a menos que se especifique otra cosa en el procedimiento de análisis, dejando que el disolvente ascienda a la distancia especificada. Secar la placa, marcar la posición del frente del disolvente y dejar que se evapore con disolvente a temperatura ambiente como se especifique.<sup>(8)</sup>

## 2.- Técnica horizontal

**Aparato.** El equipo consiste de:

- a. Placas de 50 mm de largo y 50 mm de ancho;
- b. Micropipetas de 0.5  $\mu\text{L}$  y 1.0  $\mu\text{L}$ , con una precisión de 10 por ciento del volumen prescrito;
- c. Una cámara cromatográfica para el desarrollo horizontal (ver figura 7); las cámaras disponibles comercialmente, consisten de un cuerpo para el disolvente de prueba, con un recipiente para la fase móvil con una tapa de

cerrado hermético. La fase móvil es transferida a la orilla de la capa por intercambio con rodillos de fibra de vidrio.<sup>(8)</sup>



- A.- Tope para placas cromatográficas.
- B.- Soporte para placas cromatográficas.
- C.- Salientes para sostener la placa de vidrio.
- D.- Descanso para la placa de vidrio sinterizado.
- E.- Disolvente.
- F.- Canal para el suministro del disolvente.

**Figura 6.- Cámara cromatográfica para la elución horizontal.**

**Procedimiento.** Proteger la cámara de corrientes de aire y de exposición directa de los rayos del sol, se debe tener cuidado de que la temperatura ambiente se mantenga constante. Colocar una placa limpia y seca de fibra de vidrio dentro de la cámara (después de cada uso, la placa debe limpiarse con acetona y secarse).<sup>(8)</sup>

Si se requiere de saturación, cubrir la base de la cámara con papel filtro, verter la cantidad de líquido de saturación requerida dentro de la cámara. Si se requiere de una saturación intensiva en la cámara se adicionará una placa y preparada de gel sílice, cortada a la medida, y saturada con el líquido. Como alternativa se puede utilizar una placa tipo emparedado con una placa de gel de sílice seca.<sup>(8)</sup>

Utilizar micropipetas para la aplicación de la solución a ser examinada, aplicar en la línea de inicio, que debe ser paralela y estar aproximadamente a 10 mm de distancia



del extremo inferior de la placa. Las aplicaciones deben hacerse a una distancia no menor de 10 mm de los lados de la placa, permitir una separación de al menos 5 mm entre cada aplicación. Las aplicaciones deben ser lo más pequeñas posibles, no mayores de 2 mm de diámetro. Marcar la distancia a la que se pretende que llegue el disolvente de la fase móvil según lo especifique el procedimiento para la planta en cuestión, generalmente a 60 mm de la línea de origen.<sup>(8)</sup>

Dejar secar las manchas, colocar la placa dentro de la cámara con la tapa hacia abajo, de tal manera que se encuentre en contacto con la placa de fibra de vidrio atravesando la anchura completa. Los puntos de aplicación deben encontrarse alrededor de 3 mm desde la orilla de la placa de fibra de vidrio. Cerrar la cámara con la tapa, dejando abierto la zona para introducir la fase móvil. Utilizando una pipeta, colocar el volumen requerido de la fase móvil previamente mezclada homogéneamente, usualmente 1.0 mL a 2.0 mL, dentro de la cámara e inmediatamente cerrarla. Desarrollar el cromatograma a una temperatura ambiente, a menos que se indiquen otras características en el procedimiento de prueba, dejar que el disolvente eluya a una distancia específica. Retirar la placa, marcar la posición de la distancia que recorrió el disolvente y dejar que el disolvente se evapore a temperatura ambiente o la que se especifique.<sup>(8)</sup>

#### **MGA 0681.-Índice de peróxido**

El índice peróxido es el número que expresa en miliequivalentes de oxígeno activo, la cantidad de peróxido contenido en 1 000 g de muestra.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Pesar con exactitud una cantidad de 5.0 g de la muestra, transferirlo a un matraz yodométrico de 250 mL, adicionar 30 mL de una mezcla de ácido acético glacial: cloroformo (3:2), agitar hasta disolución y adicionar 0.5 mL de solución saturada de yoduro de potasio. Tapar el matraz y dejar reposar la mezcla durante 1 min exactamente, agitar de vez en cuando; adicionar 30 mL de agua y titular gradualmente con SV de tiosulfato de sodio 0.1 M con agitación vigorosa y continuar hasta que casi desaparezca el color amarillo, adicionar 0.5 mL de SI de almidón y continuar la titulación, agitando vigorosamente hasta que desaparezca el color azul. Correr un blanco de reactivos. Calcular el índice de peróxido por con la fórmula siguiente<sup>(8)</sup>:

$$1000 M [(a - b)/m]$$

**Dónde:**

1 000= Referencia a 1 000 g de muestra

M= Molaridad de la solución de tiosulfato de sodio.

a= mililitros de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la muestra.

b= Mililitros de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación del blanco

m= Peso en gramos de la muestra

### **MGA 0241. Cromatografía**

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía (*Kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en<sup>(8)</sup>:

**Tabla 16.- Cromatografía de gases**

<b>Mecanismos de separación</b>	<b>Tipo de muestra</b>
<b>Gas-líquido (partición)</b>	Fase de vapor
	Líquida
<b>Gas-sólido (adsorción)</b>	Fase de vapor
	Líquida

**Tabla 17.- Cromatografía de líquidos**

<b>Cromatografía</b>	<b>Mecanismo de separación</b>
<b>Plana</b>	Capa delgada (adsorción)
	En papel (partición)
<b>En columna</b>	Líquido-sólido (adsorción)
	Líquido-sólido (partición)
	De intercambio iónico
	De exclusión

## Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido (Cromatografía gas-sólido) o un líquido (Cromatografía gas-líquido). En la primera el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta al soluto y el soporte, que puede ser albúmina, sílica gel, carbón, etc. y en la segunda, la partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, como sílica, vidrio, etc. y el gas que transporta al soluto. Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, ésta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas transportador a lo largo de la columna donde se distribuye entre las fases sólida y líquida. Este proceso de partición o reparto entre ambas fases está definido por el factor de capacidad ( $K'$ ), determinado bien sea por la cantidad o por tiempo de residencia de la sustancia en cuestión entre las fases respectivas<sup>(8)</sup>:

$$K' = \frac{\text{Cant. de la sustancia en la fase estacionaria}}{\text{cant. de la sustancia en la fase gaseosa}}$$

$$K' = \frac{\text{Tiempo en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo en la fase gaseosa}}$$

Mientras mayor tiempo pase el soluto en la fase estacionaria, mayor será el valor de  $K'$  y, por lo tanto, mayor el tiempo de retención, por lo que el valor de  $K'$  dependerá del soluto, la cantidad y la composición de la fase líquida, la temperatura y la velocidad de flujo de gas.<sup>(8)</sup>

**Aparato.** El aparato básico para la cromatografía de gases es relativamente simple. El gas transportador, generalmente está disponible en cilindros que tienen una válvula para regular la presión del gas (manómetro) el cual es conducido hacia un medidor, que permite el control adecuado de la velocidad de flujo del gas (flujómetro) requerida para el análisis de una muestra en particular.<sup>(8)</sup>

Los gases más utilizados como transportadores son el helio, el nitrógeno y algunos otros gases inertes, dependiendo su elección de las características del detector con que cuente el aparato. Ya que los solutos que van a ser sometidos a la cromatografía deben estar en fase de vapor, la puerta de inyección se calienta a una temperatura suficientemente alta para conseguir una vaporización rápida de la mezcla sin causar degradación térmica.<sup>(8)</sup>

Las muestras se inyectan con una jeringa a través de un sello de hule o silicón que se encuentra en la puerta de inyección. Es preferible inyectar directamente la muestra en el empaque de la columna; sin embargo, en algunos casos, la muestra

en forma de vapor se mezcla con el gas transportador antes de entrar a la columna, en donde los diferentes componentes de la muestra vaporizada son separados debido a las interacciones con la fase estacionaria.<sup>(8)</sup>

La columna generalmente es de vidrio o metal y está localizada en un horno que se mantiene a una temperatura seleccionada, la cual determina el tiempo de retención y en cierta manera la resolución y la eficiencia de la columna.<sup>(8)</sup>

Un componente que programe la temperatura permite una elución eficiente de los compuestos sobre un amplio rango de presión de vapor. Cuando los componentes salen individualmente de la columna, pasan a través del detector, el cual censa la presencia de cada uno de ellos.<sup>(8)</sup>

La temperatura del detector debe controlarse para prevenir la condensación. El uso de un determinado detector, depende de cada sustancia y se especifica en la monografía individual.<sup>(8)</sup>

Las señales del detector pasan a través de un amplificador o electrómetro que está conectado a un aparato automático que grafica la señal, esta gráfica resultante es el cromatograma, el cual se emplea para determinar la identidad y la concentración de cada uno de los componentes. El detector generalmente emite una señal proporcional a la concentración del soluto en el gas transportador cuando éste sale de la columna, de manera que el cromatograma para cada producto aparece como un pico en forma de campana a un determinado tiempo.<sup>(8)</sup> Las curvas resultantes representan exactamente el proceso de distribución tal como ha ocurrido durante el tiempo de residencia de los solutos en la columna. Cualquier problema o mal funcionamiento de cada uno de los componentes del sistema cromatográfico puede disminuir la precisión y exactitud de la medida.<sup>(8)</sup>

Los detectores más comúnmente utilizados en cromatografía de gases son los de conductividad térmica, ionización de flama, ionización de flama alcalina, captura de electrones y espectrómetro de masas.<sup>(8)</sup>

Debido a la alta conductividad térmica del helio, se usa como transportador cuando se utiliza un detector de conductividad térmica.<sup>(8)</sup>

A menos que se especifique otra cosa en la monografía individual, el uso de un detector de ionización de flama ya sea con helio o nitrógeno como gas transportador, es lo más recomendado, ya que dicho detector es sensible a todos los compuestos de carbono y tiene un rango amplio y dinámico de respuesta.<sup>(8)</sup>

Dependiendo de las necesidades y características de análisis se selecciona el gas.<sup>(8)</sup>

El detector de ionización de flama alcalina contiene una sal de un metal alcalino o un elemento de vidrio conteniendo rubidio u otro metal que proporciona una disminución de la respuesta del detector a átomos de carbono, pero aumenta la respuesta relativa a átomos de nitrógeno, azufre y fósforo varias veces, lo que lo convierte en un detector específico para análisis de pesticidas, compuestos organofosforados y halogenados.<sup>(8)</sup>

El detector de captura de electrones es también selectivo mostrando respuesta pequeña a los hidrocarburos y respuesta extremadamente altas a algunos compuestos como aquellos que contienen halógenos o cetonas.<sup>(8)</sup>

Dependiendo del tipo de análisis y cuando la detección es por captura de electrones, puede utilizarse como gas transportador el nitrógeno o argón que contengan pequeñas cantidades de metano.<sup>(8)</sup>

Dependiendo de la naturaleza del análisis, y si el método lo permite, se puede emplear el espectrómetro de masas como detector universal, ya que es altamente sensible y muy selectivo, ya que emplea como parámetro de identificación de la sustancia de interés no solo el tiempo de retención, sino también su relación masa/carga ( $m/z$ ).<sup>(8)</sup>

La velocidad de flujo del gas transportador especificado en las monografías es la velocidad del flujo de gas que está saliendo de la columna y es usualmente expresada en centímetros cúbicos a la presión atmosférica y a temperatura ambiente. La velocidad de flujo se mide comúnmente con la columna operando a su temperatura adecuada mediante un medidor de flujo conectado a la salida de ésta.<sup>(8)</sup>

El gas rápidamente se enfría y se encuentra a temperatura ambiente en el medidor de flujo. Es necesario desconectar la columna del detector para llevar a cabo esta medida.<sup>(8)</sup>

Para una velocidad de flujo determinada, la velocidad de flujo lineal a través de la columna está relacionada al cuadrado del diámetro de la misma. De esta manera, una velocidad de flujo de 60mL/min para una columna de 4mm en equivalencia a una velocidad de flujo de 15mL/min para una columna de 2mm y dan tiempos de retención semejantes.<sup>(8)</sup>

A menos que se especifique otra cosa en la monografía individual, se debe utilizar una velocidad de flujo entre 30mL/min y 60mL/min.<sup>(8)</sup>

## **Columnas.**

**Columnas capilares.** Estas columnas, las cuales están hechas usualmente con sílica fundida, tienen diámetros internos de 0.2 o 0.53 mm y de 5 m a 60 m de longitud. El líquido o fase estacionaria, la cual es algunas veces ligada químicamente a la superficie inerte, posee un grosor que va de 0.1  $\mu\text{m}$  a 1.0  $\mu\text{m}$ , y en el caso de fases estacionarias no polares este grosor puede llegar hasta 5  $\mu\text{m}$ . Este tipo de columnas están disponibles de manera comercial, y las principales ventajas que presentan sobre las columnas “empacadas” son la uniformidad del empaquetamiento.<sup>(8)</sup>

**Columnas empacadas.** En el análisis farmacéutico generalmente se emplean columnas empacadas y la manera en que se lleva a cabo el empaque tiene influencia en el movimiento relativo de los solutos a través del sistema. Las columnas deben ser de vidrio a menos que se especifique otro material, se utilizan de varias dimensiones, pero normalmente son de 0.6 m a 1.8 m de longitud y 2 mm a 4 mm de diámetro interno.<sup>(8)</sup>

Las columnas de capacidad muy baja que tienen alrededor del 5 por ciento (m/m) o menos de fase líquida en el soporte sólido, son las más adecuadas para el uso analítico. Las columnas de alta capacidad como aquellas que tienen un 20 por ciento de líquido pueden ser utilizadas para sustancias de peso molecular muy bajo.<sup>(8)</sup>

Los materiales utilizados como soporte se encuentran disponibles en varios tamaños de partícula, entre los cuales los más usados son los de malla 80 a 100 y de 100 a 120, con columnas de 2 mm a 4 mm de diámetro. El material de soporte debe ser totalmente inerte, particularmente para fármacos polares que serán separados en columnas con fase líquida de baja capacidad y baja polaridad.<sup>(8)</sup>

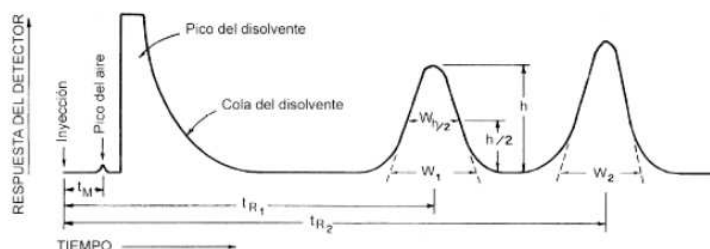
Para el análisis de fármacos, frecuentemente se utiliza tierra diatomea calcinada y lavada con ácido. Los soportes reactivos pueden ocasionar descomposición, rearrreglos o picos coleados del soluto. La reactividad del soporte se reduce tratándolo con un agente silanzante antes de adicionar la fase líquida. Los soportes que reciben un lavado alcalino adicional deben utilizarse con cuidado ya que el álcali residual descompone algunas fases líquidas. En algunas ocasiones se especifica una resina poliaromática la cual no necesita ser cubierta con una fase líquida.<sup>(8)</sup>

Las fases líquidas están compuestas por una gran variedad de sustancias tales como polietilenglicoles, ésteres, amidas de alto peso molecular, hidrocarburos y gomas de silicona (polisiloxanos sustituidos con metilos, fenilos, nitrilos, vinilos, fluoroalquilos o mezclas de estos grupos). En todos los casos, los lotes deben ser seleccionados cuidadosamente para la cromatografía de gases.<sup>(8)</sup>

La figura 7 representa un cromatograma típico de elución de dos sustancias donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención de las sustancias 1 y 2;  $h$  y  $h/2$  son la altura total

y la mitad de la altura del pico desde el ápice hasta la línea base;  $W_{h/2}$  es el ancho del pico a la mitad de la altura y  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos de las bases de los picos 1 y 2, respectivamente.<sup>(8)</sup>

El pico del aire es característico de los cromatogramas obtenidos con detector de conductividad térmica y puede aparecer antes o coincidir con el pico del disolvente;  $t_0$  es el tiempo muerto y corresponde al tiempo de retención para una sustancia que no es retenida por la columna.<sup>(8)</sup>



**Figura 7- Separación cromatográfica de dos sustancias**

Lista de fases líquidas y soportes empleadas en cromatografía de gases.<sup>(8)</sup>

### Fases

**G1** Aceite de dimetilpolisiloxano

**G2** Goma de dimetilpolisiloxano

**G3** (50%) Fenil-(50%)-metil polisiloxano

**G4** Poliéster de succinato de dietilenglicol

**G5** 3-cianopropilsiloxano

**G6** Trifluoropropilmetilpolisiloxano

**G7** (50%) 3-Cianopropil- (%) fenil metilsilicón

**G8** (80%) Bis (3-cianopropil) -(20%) 3-cianopropil fenilpolisiloxano

**G9** Metilvinilpolisilozano

**G10** poliamida de ácido C36 dicarboxílico con 1,3-di-4-piperidil propano y piperidina (1:0.9:0.2)

- G11** Poliéster de Bis-(2-etilhexil)-sebacato
- G12** Poliéster de succinato de fenildietanolamina
- G13** Sorbitol
- G14** polietilenglicol (MM promedio 950-1050)
- G15** Polietilenglicol (MM promedio 3 000-3 700)
- G16** Polietilenglicol compuesto (Mm promedio 15 000). Compuesto de alto peso molecular formado por polietilenglicol y un enlazante de diepóxido (Carbowax 20M)
- G17**(75%) Fenil-(25%) metil polisiloxano
- G18** Polialquilenglicol
- G19** (25%) Fenil-(25%) cianopropil-(50%) metil silicón
- G20** Polietilenglicol (MM promedio 380-420)
- G21** Succinato de neo-pentilglicol
- G22** Bis-(2-etilhexil)-ftalato
- G23** Adipato de polienglicol
- G24** Diisodecil ftalato
- G25** Polietilenglicol compuesto TPA. Compuesto de alto peso molecular formado por polietilenglicol y un diepóxido esterificado con ácido tereftálico (Carbowax 20M-TPA)
- G26** (25%) 2-Cianoetil-(75%) metil polisiloxano
- G27** (5%) Fenil-(95%) metil polisiloxano
- G28** (25%) Fenil-(75%) metil polisiloxano
- G29** 3-3'-Tiodipropionitrilo
- G30** tetraetilenglicol dimetil éter
- G31** Nonilfenoxipoli-(etilenoxi)-etanol (la longitud promedio de la cadena de etilenoxi es de 30) (Nonoxinol 30)
- G32** (20%) Fenil-(80%) metil polisiloxano
- G33** (20%) Carborano-(80%) metil silicona



- G34** Poliéster de dietilenglicol succinato estabilizado con ácido fosfórico
- G35** Polímero de alto peso molecular de polietilenglicol y diepóxido esterificado con ácido fosfórico
- G36** (1%9 Vinil-(5%) fenil metilpolisiloxano
- G37** Poliimida
- G38** Fase G1 conteniendo un pequeño porcentaje de inhibidor de coleo de picos
- G39** Polietilenglicol PM aprox. 1 500 (PEG 1500)
- G40** Adipato de etilenglicol
- G41** Fenilmetildimetilsilicona (10% fenil sustituido)
- G42** (35%) Fenil-(65%) demetil polisiloxano
- G43** (6%) Cianopropilfenil-(94%) dimetil polisiloxano
- G44** Grasa hidrocarburada de petrolato de bajo peso molecular (2%) y solución de hidróxido de potasio (1%)
- G45** Divinilbenceno-etilenglicol-dimetilacrilato
- G46** (14%) Cianopropilfenil-(86%) metil polisiloxano
- G47** Polietilenglicol PM aprox. 8 00 (PEG 8 000)
- G48**Cianopolisiloxano altamente polar con enlaces cruzados parciales.

**Soportes.** A menos que se especifique otra cosa en la monografía individual, el tamaño de malla debe de ser 80 a 100 o como alternativa de 100 a 120.<sup>(8)</sup>

**S1A** Tierra silíceo para cromatografía de gases, tratada de la siguiente manera: mezclar diatomita de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y calcinara a  $900^\circ\text{C}$ . Lavar la tierra silíceo con ácido, y después con agua hasta neutralizar. Esta tierra puede silanizarse con dimetildiclorosilano para enmascarar los grupos silano de la superficie.

**S1B** Tierra silíceo tratada en la misma forma que la anterior, pero lavada con un ácido y con una base. También puede silanizarse.

**S1C** Soporte separado de ladrillo refractario molido con un pegamento de arcilla y calcinado por arriba de los  $900^\circ\text{C}$  y con un lavado posterior con ácido. También puede silanizarse.

**S1NS** Tierra silíceo sin tratar

**S2** Copolímero de estireno-divinilbenceno con un área nominal de menos de 50m<sup>2</sup>/g y un diámetro de poro promedio de 0.3μm-0.4μm.

**S3** Copolímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno con un área nominal de 500m<sup>2</sup>/g a 600m<sup>2</sup>/g y un diámetro de poro promedio de 0.0075μm

**S4** Copolímero de estireno-divinilbenceno con grupos aromáticos –O y –N; con un área nominal de 400m<sup>2</sup>/g a 600m<sup>2</sup>/g y un diámetro de poro promedio de 0.0076μm.

**S5** polímero de tetrafluoroetileno de alto peso molecular, con tamaño de malla de 40 a 60.

**S6** Copolímero de estireno-divinilbenceno con un área nominal de 250m<sup>2</sup>/g a 350m<sup>2</sup>/g y un diámetro de poro promedio de 0.0091μm.

**S7** Carbón de grafito con un área nominal de 12m<sup>2</sup>/g.

**S8** Copolímero de 4-vinil-piridina y estireno-divinilbenceno.

**S9** Polímero poroso basado en óxido de 2,6-difenil-*p*-fenileno.

**S10** Copolímero de enlaces cruzados de acrilonitrilo y divinilbenceno altamente polar.

**S11** Carbón grafitado con superficie nominal de 100m<sup>2</sup>/g modificado con pequeñas cantidades de petrolato y polietilenglicol.

**S12** Carbón grafitado con superficie nominal de 100m<sup>2</sup>/g.

**Procedimiento.** Debido a que la cromatografía de gases es principalmente un método de separación, no puede utilizarse para identificar compuestos sin comparar con una sustancia de referencia (*SRef*). Para el análisis cualitativo, debe determinarse el tiempo de retención o el volumen que la sustancia de referencia (velocidad de flujo de tiempo de retención del tiempo) del pico de una sustancia conocida, inyectando al sistema una solución de dicha sustancia.<sup>(8)</sup>

Cuando el pico aparece al mismo tiempo o con el mismo volumen bajo las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de una identificación correcta es muy alta.<sup>(8)</sup>

Alternativamente, los componentes individuales pueden ser recolectados en una trampa fría conforme va saliendo de la columna para llevar a cabo otro tipo de análisis por cualquier método instrumental o químico y poder identificarlos plenamente.<sup>(8)</sup>

El tiempo de retención o el volumen para el aire es un factor importante ya que utilizado para obtener los valores de retención absolutos y relativos para la caracterización de los diferentes compuestos.<sup>(8)</sup>

Los fármacos pueden ser identificados de acuerdo a su retención relativa, determinada por la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$\text{Retención relativa} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

**Donde:**

$t_2$ = tiempo de retención medido desde el punto de inyección del fármaco en estudio.

$t_1$ = Tiempo de retención medido para una sustancia de referencia determinados en la misma columna y a la misma temperatura.

$t_0$ = Tiempo de retención para un componente inerte que no se retiene en su paso a través de la columna.

Cuando  $t_2=t_1$  es evidente que la retención relativa es igual a 1, es decir, no hay separación.<sup>(8)</sup>

En ésta y las siguientes expresiones matemáticas escritas en términos de tiempos de retención, estos pueden sustituirse con los volúmenes de retención correspondientes o las distancias en el cromatograma, ya que estos valores son proporcionales al tiempo de retención.<sup>(8)</sup>

Cuando se utiliza el detector de ionización de flama, el cual no responde ni al aire ni al agua, la retención de un compuesto que no se retenga en la columna tal como el metano, puede usarse para estimar  $t_0$ . Cuando  $t_0$  es muy pequeño, puede ser calculado directamente de los tiempos de retención ( $t_2/t_1$ ). El factor de capacidad está relacionado a la retención por la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$K' = \frac{t}{t_0} - 1$$

Se pueden obtener datos cuantitativos a partir de las áreas bajo los picos calculando éstas gráficamente o por medio de un integrador electrónico automático o un planímetro. Hay que tomar en cuenta que las áreas de los picos son menos precisas para los picos pequeños y para aquellos que tengan tiempos de retención muy cortos.<sup>(8)</sup>

En algunos casos, la altura de los picos puede sustituir a las áreas. Para minimizar errores gráficos en picos asimétricos, el producto que se obtiene al multiplicar el

ancho del pico a la mitad de la altura del mismo, puede también emplearse en vez de las áreas.<sup>(8)</sup>

En la mayoría de los casos, los análisis farmacéuticos requieren de comparaciones cuantitativas de un cromatograma con otro y en estas condiciones, la cantidad inyectada es una fuente grande de error que puede minimizarse por la adición de un estándar interno a la sustancia por analizar.<sup>(8)</sup>

La relación del área del pico de las sustancias de interés (problema y estándar de concentración conocida) al área del pico del estándar interno se compara de un cromatograma a otro mediante las siguientes expresiones<sup>(8)</sup>:

$$ArE = \frac{\text{Área del pico de referencia}}{\text{Área del pico del estándar interno}}$$

$$ArP = \frac{\text{Área del pico del problema}}{\text{Área del pico del estándar interno}}$$

**Donde:**

ArE= Área relativa de referencia.

ArP= área relativa del problema.

Las áreas relativas obtenidas se emplean para los cálculos de concentración del problema considerando la concentración de referencia y los pesos y/o disoluciones llevados a cabo con el problema.<sup>(8)</sup>

Cuando la referencia interna es químicamente similar a la sustancia problema, se pueden controlar pequeñas variaciones en parámetros de la columna y el detector, en algunos casos, la referencia interna puede adicionarse desde el inicio del procedimiento para controlar también otros aspectos cuantitativos del proceso.<sup>(8)</sup>

Al hacer las curvas de calibración, una cantidad del soluto puede ser absorbida o adsorbida en el sistema y esto se reflejará en que la recta no pasará a través del cero sino que lo hará en algún punto de la abscisa. Este efecto puede contribuir al error, particularmente en la medida de cantidades pequeñas de la sustancia y cuando se usa un simple punto de referencia.<sup>(8)</sup>

A concentraciones altas de la sustancia, el soluto puede saturar la fase líquida dando una pérdida relativa a la altura o a la simetría del pico.<sup>(8)</sup>

Para evitar estos problemas, antes de que cualquier columna sea aceptada para el análisis, es recomendable construir una curva de calibración. Cuando sea necesario concentrar por evaporación la muestra a analizar, es conveniente utilizar disolventes

con grado especial, con objeto de evitar que también se concentren las impurezas de los disolventes.<sup>(8)</sup>

Estos disolventes especiales deben especificarse en la monografía individual. Ya que muchos fármacos son moléculas polares que tienen grupos reactivos, una cromatografía adecuada puede requerir la conversión del fármaco a un derivado más volátil o menos polar por el tratamiento con reactivos específicos, esta derivatización también deberá especificarse en la monografía específica.<sup>(8)</sup>

Las columnas deben acondicionarse, antes de ser usadas, a una temperatura más alta que la especificada en la monografía individual, en el caso de polisiloxanos con constituyentes metilos o fenilos estables térmicamente, se debe seguir una rutina para aumentar la eficiencia y la característica inerte de la columna; mantener la columna a una temperatura de 250°C por una hora con un flujo de helio o nitrógeno para remover el oxígeno y los disolventes. Detener el flujo del gas, calentar a 340°C por 4 h y reducir el calentamiento hasta temperatura de 250°C. Acondicionar con el gas transportador hasta obtener un flujo estable.<sup>(8)</sup>

Una prueba adecuada para asegurar que el soporte es inerte cuando se utilizan fases líquidas de baja polaridad, es la aparición de un simple pico simétrico sin evidencia de descomposición cuando se inyecta colesterol. La columna puede adicionarse ocasionalmente por inyecciones repetidas del compuesto o la mezcla que va a ser analizada.<sup>(8)</sup>

### **Cromatografía de gases de fase de vapor.**

El método se basa en el análisis de la fase de vapor en equilibrio con la fase sólida o líquida de interés. La fase de vapor es el espacio libre superior que se encuentra entre la muestra líquida o sólida dentro de un vial, este espacio está lleno con la muestra volátil que se desprende de la muestra por medio del calentamiento del vial y por presurización interna del mismo con el gas de arrastre que se usa para el cromatógrafo de gases. La cromatografía de gases de fase vapor es un método adecuado para separar y determinar compuestos volátiles presentes en muestras sólidas o líquidas.<sup>(8)</sup>

**Aparato.** El aparato está compuesto por un cromatógrafo de gases equipado con un muestreador de fase vapor para introducir la muestra problema al sistema cromatográfico.<sup>(8)</sup>

**Muestreador de fase de vapor.** Cuenta con un módulo que controla la presión y temperatura automáticamente, pudiendo acoplarse un dispositivo para la eliminación de disolventes cuando sea necesario. La muestra se introduce en un recipiente cerrado con una tapa con un sistema de válvula que permita el paso del

gas acarreador. El recipiente se coloca en una cámara termocontrolada a la temperatura establecida de acuerdo a la naturaleza de la muestra y se mantiene a esta temperatura lo suficiente para permitir un equilibrio entre la fase sólida o líquida y la fase de vapor a analizar. El gas acarreador se introduce en el recipiente, y después del tiempo indicado, se abre la válvula de modo que el gas se expanda hacia la columna cromatográfica, arrastrando a los compuestos volátiles. De no utilizarse el equipo antes descrito, es posible el uso de jeringas herméticas para la introducción de la muestra en un cromatógrafo convencional, para esto, en una cámara por separado, permitir el equilibrio evitando cambios en éste durante el proceso de arrastre de vapor hacia la columna cromatográfica.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Determinar los parámetros del instrumento con ayuda de las preparaciones de referencia hasta producir una respuesta adecuada.<sup>(8)</sup>

**Calibración directa.** *Introducir*, tanto la sustancia a examinar como cada una de las preparaciones de referencia en recipientes idénticos por separado, como se indica en la monografía, evitando el contacto entre el muestreador y las muestras. Cerrar los recipientes de manera hermética y colocar en la cámara termocontrolada. Permitir el equilibrio y desarrollar la cromatografía bajo las condiciones indicadas en la monografía.<sup>(8)</sup>

**Adición de estándar.** *Agregar* a un juego de recipientes idénticos, volúmenes iguales de la preparación a examinar. Adicionar a todos los recipientes, excepto a uno, cantidades preestablecidas de la preparación de referencia que contenga la sustancia a examinar en concentración conocida, de modo que se genere una serie de soluciones que contengan concentraciones continuas crecientes de la sustancia. Cerrar herméticamente los recipientes y colocarlos en la cámara termocontrolada. Permitir el equilibrio y desarrollar la cromatografía de acuerdo a las condiciones indicadas en la monografía.<sup>(8)</sup>

**Cálculos.** Graficar las concentraciones promedio contra la cantidad presente en la preparación de referencia. Calcular la ecuación lineal de la gráfica usando un ajuste de mínimos cuadrados, y derivar a partir de ésta la concentración de la sustancia que se está determinando en la preparación. De otro modo, extrapolar la línea que une los puntos en la gráfica hasta que alcance el eje de concentración. La distancia entre este punto y la intercepción de los ejes representa la concentración de la sustancia que se está determinando en la preparación.<sup>(8)</sup>

## **Cromatografía líquida**

### **1.- Cromatografía plana**

#### **A) Cromatografía en capa delgada**

Esta técnica es una forma de cromatografía de adsorción que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente hojas de aluminio o placas de vidrio. Este adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente.<sup>(8)</sup>

La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. La fase estacionaria puede modificarse de acuerdo a las necesidades de separación, aunque el factor más importante para que ésta se lleve en forma adecuada es la fase móvil elegida.<sup>(8)</sup>

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y puede ser un dato valioso en la identificación de ella. Esta característica se conoce con el nombre de  $R_F$  (relación de frentes) y representa la distancia recorrida por el compuesto, con relación a la distancia recorrida por la fase móvil por lo que sus valores siempre oscilarán entre 0 y 1.<sup>(8)</sup>

$$R_F = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$$

No todas las sustancias pueden observarse, por lo que en muchas ocasiones es necesario observar la placa de cromatografía después de someterla a procesos de “revelado” dependiendo estos de las características químicas del compuesto por analizar o bien observar dichas placas bajo una fuente de luz ultravioleta.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Las placas empleadas comúnmente (cromatoplasas) son de vidrio y de las dimensiones apropiadas al uso al que serán destinadas.<sup>(8)</sup>

Estas placas se pueden adquirir ya preparadas, es decir, recubiertas con la capa del adsorbente (gel de sílice o alúmina) que se vaya a emplear o pueden prepararse en el laboratorio de la manera que se describe a continuación<sup>(8)</sup>:

**Preparación de las cromatoplasas.** Se requiere un dispositivo para extender sobre las placas una capa uniforme del material con que se va a recubrir. Se prepara una suspensión del material de recubrimiento de acuerdo a las indicaciones del fabricante y utilizando el dispositivo indicado se distribuye esta suspensión sobre las placas, las cuales deben estar limpias y secas.<sup>(8)</sup>

El grosor de la capa varía de 0.25 mm a 0.30 mm. Las placas se dejan secar al aire y se deshidratan a 110°C durante 30 min antes de utilizarse (si la monografía lo indica). Deben conservarse protegidas de la humedad.<sup>(8)</sup>

## Método

**Técnica vertical ascendente.** A menos que se indique otra cosa, la cámara para la cromatografía se emplea en condiciones de saturación, para lo cual se forma interiormente con papel filtro y se vacía dentro de éste suficiente fase móvil para humedecer el papel y que quede en el fondo una capa de disolvente de 0.5 cm a 1 cm de altura. La cámara se cierra herméticamente para evitar la evaporación de la fase y se mantiene en estas condiciones de 45 min a 1 h antes de utilizarse.<sup>(8)</sup>

Es conveniente quitarle a la cromatoplaaca dos tiras angostas del recubrimiento a ambos lados.<sup>(8)</sup>

Las soluciones que van a ser analizadas y las soluciones de las *SRef* respectivas, se aplican a una distancia de 2 cm del borde inferior de la placa y dejando 2 cm de cada lado.<sup>(8)</sup>

La aplicación se hace con ayuda de una micropipeta o una microjeringa en forma de una mancha compacta no mayor de 6 mm de diámetro o en forma de banda de no más de 2 cm de largo y no más de 6 mm de ancho, a menos que se especifique otra cosa en la monografía.<sup>(8)</sup>

Las aplicaciones de cada solución deben estar suficientemente separadas entre sí para evitar que se mezclen. La distancia que va a recorrer el frente del disolvente se determina de antemano en la placa considerando el punto aplicación como el origen, que en general son tres cuartas partes de la longitud de la cromatoplaaca.<sup>(8)</sup>

Las aplicaciones se dejan secar y la placa se introduce en la cámara conteniendo el sistema. Se tapa herméticamente y se deja a temperatura ambiente hasta que la fase móvil ascienda la distancia deseada. Se seca la placa y se deja evaporar el disolvente que la impregna.<sup>(8)</sup>

**Técnica horizontal.** Aplicar el volumen prescrito de las disoluciones en fracciones suficientemente pequeñas como para obtener muchas circulares de 1 mm a 2 mm de diámetro o bandas de 5 mm a 10 mm de longitud por 1 mm o 2 mm de ancho, a una distancia adecuada del borde inferior y de los lados de la cromatoplaaca. Aplicar las disoluciones sobre una línea paralela al borde inferior de la placa, con un intervalo de al menos 5 mm entre las manchas<sup>(8)</sup>.

Cuando se haya evaporado el disolvente de las disoluciones aplicadas, introducir la cantidad suficiente de fase móvil en el surco correspondiente de la cubeta, utilizando una jeringa o pipeta. Colocar la placa horizontalmente y colocar el dispositivo para dirigir la fase móvil siguiendo las instrucciones del fabricante.<sup>(8)</sup>

Si se indica en la monografía, desarrollar la placa comenzando simultáneamente por ambos extremos. Tapar la cubeta y mantenerla entre 20°C y 25°C. Secar la capa cuando la fase móvil haya alcanzado la distancia indicada en la monografía.



Secar la placa y visualizar los cromatogramas de la forma que se prescribe (Figura 8).<sup>(8)</sup>

**Revelado.** La localización de las manchas de interés se hace por visualización directa bajo una lámpara de luz ultravioleta (con longitudes de onda de 254nm y/o 365 nm<sup>9</sup> o bien, cuando la monografía lo recomiende, se emplea el reactivo de revelado indicado en ésta, el cual se aplica por atomización o en forma de vapores.<sup>(8)</sup>

### Adsorbentes

**CD01** Celulosa

**CD02** Celulosa microcristalina

**CD03** Celulosa F254

**CD04** Tierra silíceo G

**CD05** Tierra silíceo G F<sub>254</sub>

**CD06** Tierra silíceo H

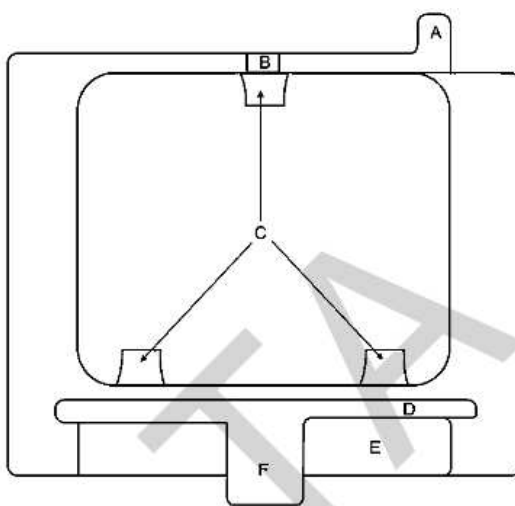
**CD07** Gel de sílice G

**CD08** Gel de sílice G F<sub>254</sub>

**CD09** Gel de sílice H

**CD10** Gel de sílice H F<sub>254</sub>

**CD11** Gel de sílice H F<sub>254</sub>silanizado



- A.- Tope para placas cromatográficas.
- B.- Soporte para placas cromatográficas.
- C.- Salientes para sostener la placa de vidrio.
- D.- Descanso para la placa de vidrio sinterizado.
- E.- Disolvente.
- F.- Canal para el suministro del disolvente.

**Figura 8.- Cámara cromatográfica para la elución horizontal.**

## **B) Cromatografía en papel**

El soporte empleado en este tipo de cromatografía es una tira de papel filtro de espesor y textura uniforme. En algunos casos se puede impregnar con líquido que sea inmiscible con la fase móvil; de esta manera, el proceso de partición se lleva a cabo entre los dos líquidos.<sup>(8)</sup>

**Aparato.** Se emplea una cámara de vidrio de dimensiones adecuadas para colocar el papel de la cromatografía, que pueda cerrarse herméticamente y que emplearse tanto para cromatografía ascendente como descendente.<sup>(8)</sup>

El papel debe ser de una absorción apropiada; este se corta en tiras de una longitud no mayor al tamaño de la cámara y de una anchura no menor de 2.5 cm. El papel debe cortarse de manera que la fase móvil corra en dirección del hilo de la fibra del papel.<sup>(8)</sup>

**Cromatografía descendente.** La tapa de la cámara de desarrollo tiene un orificio central de aproximadamente 1.5 cm de diámetro cerrado por un tapón.<sup>(8)</sup>

En la parte superior de la cámara está colocado un recipiente para el disolvente, provisto de un dispositivo, generalmente una varilla de vidrio, para sostener el papel. A ambos lados del recipiente se colocan dos varillas de vidrio en forma paralela y ligeramente arriba de los bordes superiores del recipiente de manera que sostenga el papel sin que este entre en contacto con las paredes del tanque.<sup>(8)</sup>

Se utiliza una cantidad suficiente del disolvente especificado en la monografía, para formar una capa de 2.5 cm en el fondo. La cámara se cierra y se mantiene a una temperatura de 20°C a 25°C durante 24 h previas al desarrollo cromatográfico y mientras dure dicho proceso.<sup>(8)</sup>

Se traza con un lápiz una línea fina en el papel a una distancia del extremo tal que, al colocarlos en la varilla del recipiente, la línea quede paralela y unos centímetros

por debajo de la varilla. La solución del producto en estudio se aplica sobre esta línea; la mancha no debe exceder de 1 cm de diámetro y se deja secar al aire. El papel ya preparado se introduce en la cámara, se cierra y se deja en reposo durante hora y media para que se sature. Al cabo de este tiempo se introduce por el orificio de la tapa, suficiente fase móvil en el recipiente para el disolvente; se tapa y se efectúa el desarrollo durante la distancia o tiempo descritos en la monografía, protegiendo la cámara de la luz directa durante el proceso. El papel se saca y se deja secar al aire. El método de cuantificación se describe en la monografía.<sup>(8)</sup>

**Cromatografía ascendente.** La parte superior del tanque tiene un dispositivo desde el cual se suspende el papel para cromatografía, que permita que éste descienda sin abrir la cámara. En el fondo hay una cubeta conteniendo la fase móvil hasta la cual se hará descender el papel.<sup>(8)</sup>

Se emplea una cantidad suficiente de la fase móvil elegida de manera que forme una capa de 2.5 cm en la cubeta y si es necesario, se puede poner otro disolvente entre la cubeta y las paredes de la cámara. Esta se cierra y se mantiene entre 20°C a 25°C durante 24 h previas al desarrollo cromatográfico.<sup>(8)</sup>

La muestra se aplica de la misma manera que se describió en la cromatografía descendente, pero en este caso, el extremo aplicado se coloca en la parte inferior. El papel preparado se introduce en la cámara, se tapa y se deja saturar durante una hora y media. Al cabo de este tiempo, el papel se hace descender hasta la fase móvil y se deja, para el desarrollo, durante el tiempo o la distancia descrita en la monografía, protegiendo de la luz directa. Se seca el papel y se deja secar al aire. El método de cuantificación se describe en la monografía.<sup>(8)</sup>

## II. Cromatografía en columna

### A) *Cromatografía de adsorción en columna*

El soporte sólido o adsorbente, (alúmina activada, celulosa en polvo o sílica<sup>9</sup> se introduce en forma de polvo seco o de pasta en un tubo de vidrio, de plástico o de otro material adecuado, procurando generar una masa uniforme y compacta, libre de fracturas y(o burbujas; dicho tubo debe poseer un orificio inferior echo (generalmente protegido por un disco de vidrio poroso para dar salida a la fase móvil).<sup>(8)</sup>

**Preparación de la columna.** En la parte superior de la columna se vierte una solución de la sustancia sometida a cromatografía y se deja que penetre en el adsorbente; inmediatamente después, se introduce el disolvente, que constituye la fase móvil y se le deja fluir hacia abajo por acción de la gravedad o aplicando una

presión positiva; durante todo el desarrollo de la cromatografía no debe dejarse que la parte superior de la columna se seque.<sup>(8)</sup>

La solución eluida se vigila de una manera continua (por ejemplo, con una celda de absorción ultravioleta por la que pasa), o periódica, por ejemplo, recogiendo fracciones cada cierto tiempo o cuando la elución alcanza cierto volumen o peso, y examinando después cada fracción para investigar el componente separado.<sup>(8)</sup>

### ***B) Cromatografía de partición en columna***

En este tipo de cromatografía, una fase estacionaria líquida, inmisible con la fase móvil, es adsorbida en la superficie de adsorbente sólido. La cromatografía se lleva a cabo del mismo modo que la cromatografía de adsorción en columna, teniendo cuidado de saturar la fase móvil con la fase estacionaria antes de ser usada para la elución.<sup>(8)</sup>

**Cromatografía de fase normal.** Generalmente el adsorbente sólido usado en la cromatografía de partición y la fase estacionaria adsorbida en él, son polares con respecto a la fase móvil. El adsorbente más usado en estos casos es la tierra silícica o alúmina inactiva, con partículas de diámetro y tamaño de poro adecuados para que pueda fluir fácilmente la fase móvil.<sup>(8)</sup>

**Cromatografía de fase inversa.** Es aquella en la que el adsorbente polar se convierte en no polar por silanización u otros medios (tratamiento con parafinas) y la fase fija adsorbida es menos polar que la fase móvil.<sup>(8)</sup>

En estos sistemas de partición, el grado de separación de un compuesto está regido por su coeficiente de distribución entre las dos fases líquidas y en los compuestos que se disocian, por el pH de la fase más polar.<sup>(8)</sup>

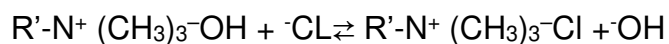
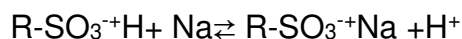
La elución selectiva se realiza por interacción diferencial de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil; esta última formada por la solución reguladora de pH y algún solvente orgánico miscible en agua, como metanol y/o acetonitrilo.<sup>(8)</sup>

### ***C) Cromatografía de intercambio iónico***

Se puede considerar como una forma especial de cromatografía en la que la fase sólida contiene un material cambiador de iones, generalmente llamado resina de intercambio iónico.<sup>(8)</sup>

El intercambio de iones consiste en el cambio reversible del ión presente en la solución con el contraión del polímero reinoso, celulosa modificada o soporte de gel

sílice; este intercambio se aprecia claramente en los siguientes ejemplos de una resina catiónica y una aniónica<sup>(8)</sup>:



La elección de las resinas, fuertes o débiles, de tipo aniónico o catiónico, dependerá en gran parte del pH en el cual deba realizarse el intercambio y de qué cationes o aniones haya que intercambiar. Sin embargo, las resinas fuertemente ácidas y básicas se prestan a la mayoría de las aplicaciones analíticas. Su capacidad específica varía desde 2 milimoles por gramo hasta 5 milimoles por gramos. En la práctica se emplea un gran exceso (200 a 300 por ciento) de resina sobre la cantidad estequiométrica calculada.<sup>(8)</sup>

El coeficiente de selectividad indica la preferencia con que una resina de intercambio iónico fija dos o más iones de una solución. En general, la resina fijará de preferencia iones bivalentes (o multivalentes) que iones monovalentes y, ante iones de la misma valencia, fijará preferentemente los más pesados.<sup>(8)</sup>

**Tratamiento de las resinas de intercambio iónico y preparación de la columna.** Sumergir en agua la resina de intercambio iónico y dejar hidratar durante 24 h; introducirla en una columna adecuada. Si se trata de una resina aniónica, transformarla en básica pasando a través de la columna una solución 2 N de hidróxido de sodio a una velocidad aproximada de 3 mL/min hasta que el eluyente no contenga cloruros, lavar con agua exenta de dióxido de carbono, para eliminar la alcalinidad. En el caso de una resina de intercambio catiónico, la conversión a la forma ácida se logra pasando solución 2N de ácido clorhídrico a través de la columna y después lavando con agua exenta de dióxido de carbono hasta que el líquido de lavado sea neutro.<sup>(8)</sup>

La columna así preparada se usa de manera análoga a la descrita por la cromatografía de adsorción en columna, con la excepción de que no suele ser necesario vigilar eluyente. Según el tipo de resina elegida y el tipo de material examinado, el volumen del eluyente obtenido se recoge y se titula con ácido o base, según convenga, utilizando un indicador apropiado.<sup>(8)</sup>

Una vez terminada la determinación, puede regenerarse la columna de intercambio de iones lavándola con solución de hidróxido de sodio 2N, si es una columna de cambio aniónico, o con solución de ácido clorhídrico 2N, si es una columna de cambio catiónico, lavando a continuación con agua hasta obtener una reacción neutra.<sup>(8)</sup>

## Resinas intercambiadoras

**II1. Intercambiador iónico débil (2X):** resina polimérica con grupos amonio cuaternarios (en forma clorada), unidos a una red polimérica de poliestireno con enlaces cruzados y 2 por ciento de divinilbenceno.<sup>(8)</sup>

**II2. Intercambiador aniónico fuertemente ácido (8X):** resina polimérica con grupos amonio cuaternarios (en forma hidroxilada), unidos a una red polimérica de poliestireno con enlaces cruzados y 8 por ciento de divinilbenceno.<sup>(8)</sup>

**II3. Intercambiador aniónico fuertemente básico:** resina polimérica con grupos amonio cuaternario unidos a una red polimérica de látex con enlaces cruzados con divinilbenceno.<sup>(8)</sup>

**II4. Intercambiador catiónico débil:** resina de polimetacrilato ligeramente ácida, con grupos carboxilos en forma protonada.<sup>(8)</sup>

**II5. Intercambiador catiónico (4X):** polímero de poliestireno con enlaces cruzados y 4 por ciento de divinilbenceno, con grupos sulfónicos ácidos (en forma protonada).<sup>(8)</sup>

**II6. Intercambiador catiónico fuertemente ácido (8X):** polímero de poliestireno con enlaces cruzados y 8 por ciento de divinilbenceno, con grupos Sulfónicos ácidos (en forma protonada).<sup>(8)</sup>

**II6Ca. Intercambiador catiónico (8X):** polímero de poliestireno con enlaces cruzados y 8 por ciento de divinilbenceno, con grupos Sulfónicos ácidos (con calcio como contraión).<sup>(8)</sup>

## Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Esta técnica es conocida también como Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (CLAP).<sup>(8)</sup>

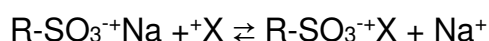
El éxito en la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud y el diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc.<sup>(8)</sup>

La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad de concentraciones y sus tiempos de retención

en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención ( $t_r$ ) se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.<sup>(8)</sup>

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria da lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida; esto es líquido-líquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles.<sup>(8)</sup>

Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido-líquido. La cromatografía líquido-sólido o de adsorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto, retenidas. La cromatografía de intercambio iónico, en la cual la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como  $-\text{SO}_3^-$ , junto con iones de carga opuesta (contraión). Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera las moléculas de muestras iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico, como lo muestra el siguiente ejemplo<sup>(8)</sup>:



Por último, la cromatografía de exclusión molecular, en la cual el empaque es un material poroso donde el tamaño del poro está bien definido. De esta manera, las moléculas que son demasiado grandes para el poro eluyen entre las partículas y salen rápidamente de la columna, mientras que las que son pequeñas penetran en los poros aumentando su recorrido y prolongando su tiempo de elución. Este tipo de cromatografía es muy empleado para separar compuestos por su tamaño molecular.<sup>(8)</sup>

Existen modificaciones a los tipos de cromatografía mencionados como la cromatografía de fases enlazadas en la cual la fase estacionaria está unida químicamente a las partículas del soporte. Este empaque se puede considerar de lo más ampliamente empleados, ya que es muy estable y la fase estacionaria no se pierde fácilmente por el uso. Esta variante de cromatografía se puede llevar a cabo en fase normal o fase inversa. En la primera se utilizan empaques polares que funcionan de manera semejante a la cromatografía líquido-sólido (adsorción). La cromatografía de fase inversa, involucra una fase estacionada relativamente poco polar como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidas a los grupos silano del soporte y se utiliza por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares.<sup>(8)</sup>

Otra modificación a las técnicas tradicionales de cromatografía es la cromatografía de par iónico que es una combinación de la cromatografía de par iónico que es una combinación de la cromatografía líquido-líquido (o fase enlazada) con la cromatografía de intercambio iónico.<sup>(8)</sup>

La separación entre dos picos, o *resolución*, depende tanto de la *selectividad* como de la *eficiencia* cromatográfica.<sup>(8)</sup>

La selectividad es una función de la retención que la molécula tiene a lo largo del proceso de separación, y está reflejado por el *factor de capacidad* ( $K'$ ).<sup>(8)</sup>

$$K' = \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{o} \quad K' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

La *selectividad* de una columna, también referida como *retención relativa* o *separación entre picos* ( $\alpha$ ), es la relación entre los factores de capacidad ( $K'$ ) de dos picos adyacentes<sup>(8)</sup>:

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1} \quad \text{o} \quad \alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

Por su parte, la *eficiencia* es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, y está reflejada por el número de platos teóricos ( $N$ ) de la columna donde se realiza el proceso cromatográfico<sup>(8)</sup>:

$$N = 16 \left( \frac{t}{w} \right)^2$$

Por lo anterior, la *resolución* ( $R$ ) puede expresarse en términos de selectividad y eficiencia de la siguiente manera:

$$R = \frac{N}{4} (\alpha - 1) \left( \frac{k}{1 + k} \right)$$

En donde  $k$  es el promedio de  $k'_1$  y  $k'_2$ .<sup>(8)</sup>

Esta ecuación permite controlar la resolución ( $R$ ) variando el factor de selectividad ( $\alpha$ ), la eficiencia de la columna ( $N$ ), o bien, el factor de capacidad ( $K'$ ).<sup>(8)</sup>

El factor de separación se varia modificando la composición de la fase móvil (pH y proporción orgánica/acuosa) y/o la estacionaria (longitud de cadena alifática o grupos sustituyentes). La eficiencia se varia con cambios en la longitud de la columna, en la velocidad de flujo del disolvente y tamaño de partícula, y el factor de capacidad se modifica con cambios en la fuerza elutrópica del disolvente.<sup>(8)</sup>



El uso de integradores evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.<sup>(8)</sup>

Como en la cromatografía de gases, en esta técnica es conveniente también la adición de una referencia interna que minimiza errores de inyección, medición o proceso de la muestra, dicha sustancia debe, de preferencia, ser químicamente similar al activo o activos de interés, pero con un tiempo de retención diferente a el (ellos), esto (estos) para que su comportamiento en el proceso de separación y detección no presente grandes variaciones. Esta sustancia debe especificarse en la monografía y su área debe relacionarse al área de los picos de la muestra obteniendo así un área relativa constante que no se ve afectada por variaciones en el proceso de separación de la muestra o del volumen inyectado de la misma.<sup>(8)</sup>

**Equipo.** Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes<sup>(8)</sup>:

- a) **Sistema de bombeo.** Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante.<sup>(8)</sup>

Existen básicamente dos tipos de bombeo y cada uno tiene sus ventajas y sus desventajas. Estos tipos son<sup>(8)</sup>:

**Bombas de flujo constante.** -Mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre estas se encuentran las “bombas reciprocantes”, que funcionan a base de pistones en número par, las cuales impulsan el disolvente que entra a las cámaras con una capacidad de volumen pequeña; estas bombas pueden generar pulsaciones de la fase móvil que producen perturbaciones en la línea base; las pulsaciones se corrigen mediante dispositivos especiales.<sup>(8)</sup>

Otro tipo de bombas de flujo son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o como amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo émbolo actúa mediante un espiral que empuja el disolvente y la segunda amplifica la presión del disolvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo de bombas reducen las pulsaciones del disolvente.<sup>(8)</sup>

**Bombas de presión constante.** - Estas tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que, si estos parámetros se mantienen, se controla totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea presión de un gas inerte para presurizar el disolvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el disolvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para

estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto del disolvente con el gas comprimido.<sup>(8)</sup>

Estos normalmente son sistemas isocráticos, es decir, que mantiene constante la proporción de los disolventes en la fase móvil, sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores de  $K'$ , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial (gradiente cóncavo o convexo), las proporciones iniciales de los disolventes. En estos casos los disolventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentando cada uno a su respectiva bomba.<sup>(8)</sup>

Los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros.<sup>(8)</sup>

**b) Sistema de inyección.** Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de “paquete” pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.<sup>(8)</sup>

Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa; esta tiene que atravesar un *septoy* soportar la presión del sistema, la presión del volumen de inyección depende de la jeringa empleada y de la persona que realiza el llenado de la misma y la inyección de la muestra.<sup>(8)</sup>

Un segundo y mejor sistema consiste en inyector con *asas* intercambiables de volumen fijo, las cuales pueden llenarse con un exceso de muestra; estos dispositivos desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector y arrastrando un volumen constante de la muestra. Estos sistemas son más precisos, pero se tienen que estar cambiando cuando es necesario inyectar volúmenes diferentes en una corrida analítica.<sup>(8)</sup>

Un tercer sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector *automático*. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar mediante el uso de un mecanismo servo-regulado. Con estos sistemas se pueden inyectar volúmenes diferentes a lo largo de una corrida, con alto grado de precisión y exactitud.<sup>(8)</sup>

**c) Detector.** Puede ser de dos tipos: Tipo 1-aquellos que miden alguna propiedad de la fase móvil, y Tipo 2 -aquellos que miden alguna propiedad del analito.<sup>(8)</sup>

La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. Los detectores más usados son<sup>(8)</sup>:

**Tipo 1:**

Detector de Índice de Refracción

Detector de Conductividad eléctrica

**Tipo 2:**

Detector de luz UV/VIS (longitud fija o arreglo de diodos)

Detector de Radioactividad (con contador alfa, beta, gamma)

Detector de fluorescencia (fijos o con monocromador de excitación y de emisión)

Detector Electroquímico (Amperométricos y Coulométricos)

Espectrómetro de masas (sencillos o en "tandem")

Los detectores tipo 1 son completamente inespecíficos y detectan variaciones en la propiedad en particular (refracción o conductancia) de la fase móvil, y cualquier cambio de la fase producido por viscosidad, temperatura o luz puede alterar el comportamiento del detector.<sup>(8)</sup>

Los detectores tipo 2 son muy específicos y miden alguna propiedad intrínseca de la molécula a medir.<sup>(8)</sup>

**d) Columna.** Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer y las características serán mencionadas posteriormente.<sup>(8)</sup>

Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desee hacer. Si el objeto de la separación es aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores ya que deben tener la capacidad de contener

cantidades elevadas de la muestra. Las más comunes son las fabricadas con acero inoxidable, aunque también las hay de vidrio. La longitud puede ser de 10 cm a 1 m. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de éste, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.<sup>(8)</sup>

La eficiencia de las columnas se ha elevado con dispositivos y técnicas de empaque que mejoran el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil. Uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas.<sup>(8)</sup>

Por lo que respecta a las columnas y su relleno, este puede ser a base de partículas de una cerámica inorgánica (silica o alúmina) o un polímero orgánico (poliestireno-divinilbenceno o metacrilatos). Se debe considerar la influencia de la geometría de la partícula en el empacamiento de la columna y por tanto en la eficiencia de la separación (partícula irregular o esférica). Se debe considerar también la porosidad de la partícula y la influencia que el tamaño del poro puede tener, sobre todo en separaciones fundamentadas en la diferencia de pesos moleculares. Se considera que el tamaño promedio de un poro de partículas de sílica para aplicaciones analíticas es de  $100\text{Å} \pm 20\text{Å}$ .<sup>(8)</sup>

Aunado al tamaño del poro está la cantidad de poros que cada partícula presenta, lo cual le va a dar cierto grado de rigidez (poco porosa será mecánicamente muy resistente; muy porosa presentará mayor superficie de separación, pero será más frágil). Una sílica con un volumen de poro específico de 1 mL/g se considera un material promedio.<sup>(8)</sup>

Otro parámetro importante asociado a la partícula es su tamaño; generalmente partículas de gran tamaño se emplean en cromatografía preparativa, en tanto que partículas pequeñas se emplean en separaciones muy rápidas. Los tamaños de partícula disponibles comercialmente son<sup>(8)</sup>:

- a.  $>10\text{ }\mu\text{m}$ , para técnicas preparativas.
- b.  $10\text{ }\mu\text{m}$ , cromatografía semi-preparativas
- c.  $5\text{ }\mu\text{m}$ , es el tamaño más común en técnicas analíticas.
- d.  $3\text{ }\mu\text{m}$ , para separaciones muy rápidas.

En el caso de los materiales empleados en la fase reversa, se deben considerar también la densidad de cadenas alifáticas unidas a la sílica base, los grupos silanoles libres y si estos han tenido un tratamiento posterior para desactivarlos.<sup>(8)</sup>

Las dimensiones de las columnas analíticas van de los 30 mm a los 300 mm de longitud, y de los 0.5 mm a los 4.6 mm de diámetro.<sup>(8)</sup>

Otra manera de mejorar la eficiencia y resolución es el empleo de hornos que mantienen una temperatura constante a lo largo de la columna. Cuando se tienen valores de  $K'$  muy semejantes entre dos o más analitos, es conveniente el empleo de temperatura para lograr buenas separaciones.<sup>(8)</sup>

A continuación, se presenta una lista de los empaques empleados en cromatografía de líquidos a alta presión.<sup>(8)</sup>

### **Soportes para CLAR**

- 1.1** Octadecil-silano enlazado químicamente a sílica porosa o a micropartículas de cerámica de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.2** Octadecil-silano enlazado químicamente a gel de sílice con una superficie de porosidad controlada y que a su vez está unida a un núcleo sólido esférico de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.3** Partículas de sílica porosa de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro
- 1.4** Gel de sílice con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro
- 1.5** Alúmina con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.6** Empaque de intercambio catiónico fuerte: polímero de fluorocarbón sulfonado cubriendo un núcleo sólido esférico de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.7** Octilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica totalmente porosa de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.8** Capa monomolecular de aminopropilsilano enlazada químicamente a un soporte de gel de sílice porosa de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro
- 1.9** Gel de sílice totalmente porosa e irregular de 10  $\mu\text{m}$  con una cubierta enlazada químicamente de un intercambiador catiónico fuertemente ácido.
- 1.10** Grupos nitrilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.11** Grupos fenilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.12** Empaque de intercambio aniónico fuerte formado por una amina cuaternaria enlazada químicamente a un núcleo esférico de sílica de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 1.13** Trimetilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica porosa de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.14** Gel de sílice de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con un recubrimiento enlazado químicamente de un intercambiador aniónico de amonio cuaternario fuertemente básico.

**1.15** Hexilsilano químicamente enlazado a sílica totalmente porosa de 3  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.16** Dimetilsilano químicamente unido a partículas de sílica porosa, de 3  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.17** Resina de intercambio catiónico fuerte consistente de un Copolímero de estireno-divinilbenceno, con grupos sulfonato en forma protonada, de 7  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.18** Grupos amino y ciano químicamente unidos a partículas de sílica porosa, de 3  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro,

**1.19** Resina de intercambio catiónico fuerte consistente con un copolímero de estireno-divinilbenceno, con grupos sulfonato con calcio como contraión, de 7  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.20** Grupos dihidroxipropano químicamente unidos a partículas de sílica porosa, de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.21** Partículas esféricas de copolímero estireno-divinilbenceno, de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.22** Resina de intercambio catiónico con grupos sulfonato, hecha con gel de poliestireno, partículas con diámetro de 10  $\mu\text{m}$ .

**1.23** Resinas de intercambio aniónico hechas de gel poroso de polimetacrilato-poliacrilato con grupos amonio cuaternarios, de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.24** Gel hidrofílico semirígido formado por polímeros de vinilo con grupos hidroxilo expuestos en la superficie de la matriz, de 32  $\mu\text{m}$  a 63  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.25** Tamiz molecular 100-5 000. Resina de polimetacrilato con uniones cruzadas con éter polihidroxilado.

**1.26** Butilsilano unido químicamente a partículas totalmente porosas de sílica, de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.27** Partículas de sílica porosa de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**1.28** Soporte multifuncional amino-C8 con base de sílica esférica.

- 1.29** Gamma alúmina para fase reversa. Partículas de polibutadieno de bajo porcentaje de carbono, unidas a la alúmina, tamaño de poro 8Å, 5 µm de diámetro.
- 1.30** Etilsilano químicamente unido a sílica totalmente porosa, 3 µm a 10 µm de diámetro.
- 1.31** Resina intercambiadora aniónica fuerte. Copolímero de etilvinilbenceno-55 por ciento divinilbenceno, con macroporos de 2 000Å, diámetro 8.5 µm.
- 1.32** Ligando quirál. Complejo L-prolina/cobre unido a partículas irregulares de sílica de 5 µm a 10 µm de diámetro.
- 1.33** Sílica esférica para separación de proteínas de 4 000 a 40 000 kDa.
- 1.34** resina de intercambio catiónico fuerte. Copolímero de estireno-divinilbenceno con grupos sulfonato de forma libre, 9 µm de diámetro.
- 1.35** Sílica esférica estabilizada con zirconio con una monocapa hidrofílica tipo "diol", con un tamaño de poro de 150Å.
- 1.36** 3,5-dinitrobenzoil derivado de L-fenilglicina, unido covalentemente a aminopropil sílica de 5 µm de diámetro.
- 1.37** Gel de polimetacrilato para separación de proteínas de 2 000 kDa a 40 000 kDa.
- 1.38** Empaque de exclusión molecular basada en metacrilato, para muestras hidrosolubles.
- 1.39** Resina hidrofílica de gel de polihidroximetacrilato.
- 1.40** Celulosa tris-3,5-dimetilfenilcarbonato unida a sílica porosa, de 5 µm a 10 µm de diámetro.
- 1.41** Alfa 1-glicoproteína ácida inmovilizada en partículas esféricas de sílica de 5 µm de diámetro.
- 1.42** Octilsilano y octadecilsilano químicamente unido a sílica totalmente porosa, 3 µm a 10 µm de diámetro.
- 1.43** Pentafluorofenil químicamente unido a partículas de sílica, 5 µm a 10 µm de diámetro.
- 1.44** Soporte multifuncional de intercambiador catiónico sulfónico con octilsilano químicamente unido a partículas de sílica de 60Å, 5 µm a 10 µm de diámetro.
- 1.45** Beta-ciclodextrina químicamente unido a partículas de sílica, 5 µm a 10 µm de diámetro.

**1.46** Aglomerado de poliestireno-divinilbenceno con grupos amino cuaternarios en una base de látex, 10  $\mu$ m de diámetro.

**1.47** Intercambionico microporoso de alta capacidad, con grupos trimetilamino; 8  $\mu$ m de diámetro.

**1.48** Resinas de poliestireno sulfonatada, con enlaces cruzados con cubierta externa de "submicron", de 15  $\mu$ m de diámetro.

**1.49** Polibutadieno sobre partículas esféricas de zirconia, de 3  $\mu$ m a 10  $\mu$ m de diámetro.

**1.50** Resina multifuncional de fase reversa con intercambiador aniónico fuerte. La resina es un copolímero de etilvinilbenceno -55 por ciento de enlaces cruzados con divinilbenceno, sobre soportes de látex de 3  $\mu$ m a 10  $\mu$ m de diámetro.

**1.51** Amilosa tris-3,5-dimetilfenilcarbamato sobre partículas esféricas de sílica de 3  $\mu$ m a 10  $\mu$ m de diámetro.

**1.52** resina de intercambiador catiónico fuerte a base de sílica porosa y grupos sulfopropilo; partículas de 5  $\mu$ m a 10  $\mu$ m de diámetro.<sup>(8)</sup>

**Registrador de señales.** Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste debe ser registrada por un graficador, un *integrador* o un *sistema computarizado* de procesamiento de datos. En el caso del graficador es necesario ajustar la velocidad de la carta y la ganancia de la señal para obtener un cromatograma adecuado, y calcular manualmente la intensidad de la respuesta generada por cada pico. El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base hasta el máximo del pico, aunque es deseable tener una línea base estable para obtener la máxima precisión. Otros métodos de medición involucran el cálculo del área bajo el pico. Dicha área puede calcularse de muy diversas maneras, si el pico es simétrico pueden medirse el área por triangulación prolongando los lados del pico hasta la línea base midiendo el ancho y la altura del pico. Otra forma es utilizando un planímetro o bien, recortando y pesando el área obtenida.<sup>(8)</sup>

El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.<sup>(8)</sup>

Por último, el empleo de una computadora y el software adecuado puede facilitar el procesamiento de los datos desde el algoritmo empleado para la integración, hasta



la construcción de curvas de calibración y cuantificación de los picos. Dichos programas deben cumplir con ciertos criterios de aseguramiento de la calidad.<sup>(8)</sup>

**Verificación del sistema.** El buen funcionamiento de un sistema cromatográfico (líquido o gases) se verá reflejado en la calidad de análisis. Es necesario por esta razón considerar todos los componentes del sistema (columna, velocidad de flujo, flujo de gas transportador, temperatura de operación, entre otros para obtener resultados óptimos).<sup>(8)</sup>

Es conveniente preparar una curva de calibración a concentraciones adecuadas, a las condiciones especificadas para el fármaco en análisis, así como inyectar blancos para poder detectar alguna posible interferencia.<sup>(8)</sup>

Las especificaciones de la columna y los parámetros de instrumento en la monografía correspondiente no excluyen otras condiciones de operación adecuadas. Las variaciones normales en el equipo y en los materiales pueden requerir ajustes de las condiciones experimentales para obtener una operación aceptable.<sup>(8)</sup>

Para asegurar la efectividad del sistema, es necesario someterlo a una prueba antes de utilizarse. La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico completo el cual puede someterse a una prueba general de funcionamiento de sistema. Se pueden obtener datos específicos de inyecciones específicas (no menos de seis inyecciones) de una preparación ya sea de la muestra, de la *SRef* o del estándar interno.<sup>(8)</sup>

Estos datos pueden ser comparados con valores máximos y mínimos especificados tales como, eficiencia, presión interna, resolución, tiempo de retención, naturaleza de la curva de calibración, respuesta y recobros (entre otros parámetros), de acuerdo a lo especificado en las monografías individuales.<sup>(8)</sup>

El parámetro más útil es la reproducibilidad de inyecciones repetidas de la solución analítica mezclada con la solución de estándar interno, preparadas a partir de la *SRef* como se indica en la monografía individual. La reproducibilidad de las inyecciones repetidas se expresa como el coeficiente de variación de acuerdo con la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$CV = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

**Donde:**

CV = Coeficiente de variación expresado en por ciento

$\bar{x}$  = Media de una serie de n determinaciones

$X_i$  = Medida individual

Cuando se utiliza el estándar interno la  $X_i$  usualmente se refiere a la medida del área relativa, ( $A_s$ ):

$$X_i = A_s = \frac{ar}{ai}$$

**Donde:**

$ar$  = Área del pico correspondiente a la sustancia problema.

$ai$  = área del pico correspondiente al estándar interno.

Cuando se utiliza la altura del pico para la cuantificación, la media  $X_i$ , indica la altura relativa, ( $H_s$ ), donde  $h_r$  es la altura del pico correspondiente a la sustancia problema y  $h_i$  es la altura del pico correspondiente a la referencia interna.<sup>(8)</sup>

$$X_i = H_s = \frac{h_r}{h_i}$$

Algunas veces es útil establecer un factor de coleo para limitar la máxima permisible con relación a la simetría del pico (figura 11). Para propósitos farmacopeicos, el factor de coleo  $t$ , se define como la relación de la distancia del ancho del pico,  $W_{0.05}$ , dividido entre dos veces la distancia,  $f$ , del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5 por ciento de la altura partiendo de la línea base. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad y el valor de  $T$  aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado.<sup>(8)</sup>

El cálculo se expresa por la fórmula y la figura 9.

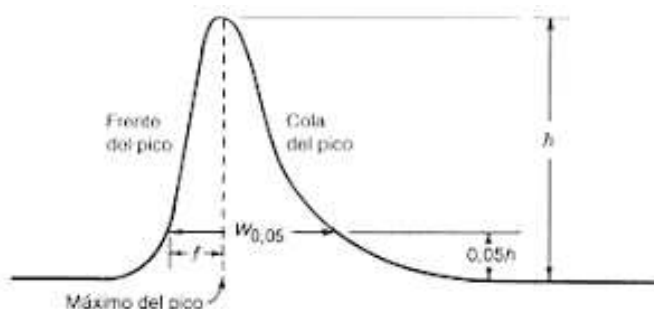
$$\text{Factor de coleo} = T = \frac{W_{0.025}}{2f}$$

Una medida de la eficiencia de una columna en particular se puede conocer calculando el número de platos teóricos ( $N$ ) en la columna con la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$N = 16 \left( \frac{t}{W} \right)^2$$

$t$  = Tiempo de retención de la sustancia.

W = Ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base, en las mismas unidades de tiempo que t.



**Figura 9.- Pico cromatográfico asimétrico**

El valor de N es dependiente de la sustancia que está siendo analizada y de las condiciones de operación tales como la velocidad de flujo, la temperatura, la cantidad del empaque de la columna y la uniformidad de éste.<sup>(8)</sup>

Como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla, la resolución, R, se determina por la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$R = 2 \frac{t_2 - t_1}{W_2 + W_1}$$

**Dónde:**

$t_2$  y  $t_1$  = Tiempos de retención para los componentes.

$W_2$  y  $W_1$  = Anchos correspondientes de las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base.

El factor de resolución ( $R$ ) es importante para asegurar la separación de dos componentes que eluyen muy cercano uno del otro y para establecer la eficiencia del sistema.

### **MGA 0251. Densidad relativa**

La determinación de la densidad se basa en la relación de la masa de la sustancia a 20°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.<sup>(8)</sup>

### **Método I**

#### **Descripción, limpieza y verificación del picnómetro**

**Limpieza del picnómetro.** Lavar el picnómetro de acuerdo con las indicaciones establecidas en el apartado de *Limpieza del material de vidrio, Capítulo de generalidades*.<sup>(8)</sup>

**Verificación del picnómetro.** Efectuar la calibración a 20°C. Ensamblar y pesar el picnómetro vacío y seco en una balanza analítica, registrando la masa en gramos, hasta la cuarta cifra decimal.<sup>(8)</sup>

Retirar la tapa del tubo capilar y el tapón esmerilado con el termómetro. Llenar el picnómetro con agua purificada recientemente hervida y enfriada a 20°C. Colocar el tapón esmerilado con el termómetro adaptado cuidadosamente y dejar que el exceso de agua salga por el tubo capilar.<sup>(8)</sup>

Verificar que no haya burbujas en el interior del cuerpo del picnómetro y del capilar. Colocar el picnómetro lleno y ensamblado, pero sin tapa, en un baño a 20°C. El nivel de agua del baño, quedará arriba de la marca de graduación del picnómetro. Al equilibrar el sistema a 20°C, ajustar el volumen del tubo capilar, de tal manera que el menisco del líquido quede tangente al aforo. Secar muy bien el exterior y boca del capilar. Colocar la tapa ajustándola bien. Sacar el picnómetro y secar escrupulosamente por todo el exterior con papel absorbente, hasta que no queden gotas ni rastro de humedad, tener especial cuidado con la base del ramal y en la comisura de la junta del tapón esmerilado con el cuello del cuerpo. Registrar la masa hasta la cuarta cifra decimal. Calcular la masa del agua contenida en el picnómetro mediante la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$C = B - A$$

**Donde:**

C= Masa del agua.

B= Masa del picnómetro lleno con agua en gramos.

A= Masa del picnómetro vacío en gramos.

**Procedimiento.** Las mediciones se realizarán a la temperatura indicada en la monografía individual. En caso contrario realizar las mediciones a 20°C. Proceder como se indica en *Verificación del picnómetro*, sustituyendo el agua por la muestra. Calcular la masa de la muestra.<sup>(8)</sup>

La densidad relativa de la muestra se calcula mediante la siguiente fórmula<sup>(8)</sup>:

$$DR = (D/C)$$

**Dónde:**

DR= densidad relativa de la muestra.

D= Masa de la muestra en gramos.

C= Masa del agua en gramos.

**Método II**

El procedimiento incluye el uso del densímetro transductor oscilante. El aparato consiste en lo siguiente<sup>(8)</sup>:

- a. Tubo en forma de U, por lo general de vidrio de borosilicato, que contiene el líquido que se va a examinar.
- b. Sistema de excitación magnetoeléctrica o piezoeléctrico que hace oscilar el tubo como un oscilador en forma uniforme a una frecuencia constante que depende de la densidad del líquido que se va a examinar.
- c. Medio para determinar el periodo de oscilación (T), que el aparato puede convertir para arrojar una lectura directa de densidad o que puede ser utilizado para calcular densidades a través de las constantes A y B descritas más adelante.
- d. Medio para determinar o controlar la temperatura del transductor oscilante que contenga el líquido que se va a probar.<sup>(8)</sup>

El periodo de oscilación es una función constante de resorte ( $c$ ) y de la masa del sistema: en donde  $p$  es la densidad del líquido que se va a probar,  $M$  es la masa del tubo y  $V$  es el volumen del tubo lleno.<sup>(8)</sup>

$$T^2 = 1 + \left[ \frac{M}{c} + \frac{pcV}{c} \right] x 4\pi^2$$

La introducción de dos constantes:

$$A = c/(4\pi^2 x V)$$

$$B = M/V$$

Lleva a la ecuación clásica del transductor oscilante.

$$p = A x T^2 - B$$

El peso específico del líquido está dado por la fórmula:

$$\frac{\rho(L)}{\rho(W)}$$

**Donde:**

$\rho(L)$ = Densidad del líquido

$\rho(W)$ = Densidad del agua

Ambas densidades se determinan a 20°C a menos que se especifique otra cosa en la monografía individual.<sup>(8)</sup>



**Figura 10.- Pícnómetro**

**Verificación.** Las constantes A y B se determinan al operar un instrumento en el tubo en forma de U, lleno con dos muestras diferentes con densidades conocidas (por ejemplo, agua purificada y desgasificada, y aire). Llevar a cabo las mediciones de control diariamente usando agua purificada y desgasificada. Los resultados mostrados para las mediciones de control usando agua purificada y desgasificada no se desvían el valor de referencia ( $\rho_{25} = 0.997043 \text{ g/cm}^3$ ) más allá del error especificado. La presión es una función de la capacidad de repetición y de la estabilidad de la frecuencia del oscilador. Los densímetros pueden obtener mediciones con un error del orden de  $1 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3 \pm 1 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$  y una capacidad de repetición de  $1 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$  a  $1 \times 10^{-6} \text{ g/cm}^3$ .<sup>(8)</sup>

Por ejemplo, un instrumento especificado a  $\pm 1 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$  debe mostrar  $0.9970 \text{ g/cm}^3 \pm 0.0001 \text{ g/cm}^3$  para poder tomarse en mediciones posteriores o de lo contrario realizar la limpieza de la celda de acuerdo con las instrucciones del fabricante, volver a realizar la verificación. Si no cumple los requisitos necesitará un

ajuste y se deberá llevar a cabo la calibración con materiales de referencia certificados.<sup>(8)</sup>

**Procedimiento.** Seguir las instrucciones del fabricante para llevar a cabo las mediciones empleando el mismo procedimiento que el utilizado para la calibración. Si es necesario equilibrar el líquido que será examinado a 20°C antes de introducirlo en el tubo para evitar la formación de burbujas y reducir el tiempo necesario para obtener la medición. Los factores que afectan la precisión son los siguientes<sup>(8)</sup>:

- a. Uniformidad de la temperatura en todo el tubo.
- b. Falta de linealidad en el rango de densidad
- c. Efectos resonantes parásitos y
- d. Viscosidad si los densímetros transductores oscilantes empleados no proporcionan compensación automática para la influencia de la viscosidad de la muestra.<sup>(8)</sup>

## **MGA-FH 0250. Identificación de compuestos carbonílicos**

### **Preparación de soluciones**

**Clorhidrato de hidroxilamonio, solución etanólica.** Disolver 50 g de cloruro de hidroxilamonio en aproximadamente 100 mL de agua; añadir aproximadamente 800 mL de etanol al 95 por ciento (v/v) y después 10 mL de la solución etanólica de azul de bromofenol y diluir a 100 mL con etanol al 95 por ciento (v/v). Agregar la solución etanólica de hidróxido de potasio hasta que la solución es verde, si el líquido se observa en una capa delgada, o hasta rojo, si la capa es gruesa.<sup>(8)</sup>

Un color limón-amarillo se deberá obtener cuando 0.05 mL de la solución de clorhídrico sea añadida a 20 mL de la solución, y un color rojo deberá observarse cuando 0.05 mL de la solución de hidróxido de potasio sea añadida a otros 20 mL de la solución.<sup>(8)</sup>

La solución es estable por una semana.<sup>(8)</sup>

**Azul de bromofenol, solución etanólica.** Disolver con calentamiento, 0.2 g de azul de bromofenol en 3 mL de solución etanólica de hidróxido de potasio, 0.1 M y 10 mL de etanol al 95 por ciento. Después de enfriar, diluir a 100 mL con el mismo etanol.<sup>(8)</sup>

### **Titulación colorimétrica**

Este método es aplicable a aceites esenciales ligeramente coloreados.<sup>(8)</sup>

Transferir 20 mL de la solución de clorhidrato de hidroxilamonio en el matraz conteniendo la muestra. Agregar 15 mL de la solución de hidróxido de potasio en

etanol 0.5 M. dejar en reposo o hervir a reflujo el tiempo estipulado en la monografía específica para el aceite esencial en particular.<sup>(8)</sup>

Titular con solución de ácido clorhídrico 0.5 M hasta punto final amarillo verdoso. Utilizar azul de bromofenol como indicador.<sup>(8)</sup>

### **Titulación potenciométrica**

Este método es aplicable a aceites esenciales fuertemente coloreados.<sup>(8)</sup>

Transferir, 50 mL de la solución de clorhidrato de hidroxilamonio en el matraz conteniendo la muestra de prueba e inmediatamente añadir 25 mL de la solución etanólica de hidróxido de potasio. Tapar el matraz con su tapón de vidrio y mezclar bien el contenido con agitación. Dejar en reposo a temperatura ambiente, o hervir a reflujo, por el tiempo estipulado en la especificación de Estándar Internacional para el aceite esencial en particular.<sup>(8)</sup>

Titular potenciométricamente con la solución de ácido clorhídrico, agitando.<sup>(8)</sup>

Calcular el volumen de solución de ácido clorhídrico utilizada en el punto de equivalencia a partir de la curva de titulación o de las lecturas de las lecturas del cambio de pH. Se deberá hacer énfasis que, de acuerdo al aceite esencial de que se trate, el pH en el punto final no será siempre el mismo, por lo que se excluye la titulación a un pH fijo.<sup>(8)</sup>

### **Cálculo de resultados**

El valor de carbonilo, expresado en miligramos de hidróxido de potasio por gramo de aceite esencial, está dado por la fórmula<sup>(8)</sup>:

$$56.1 \times \frac{(V_0 - V_1) \times c}{m}$$

#### **Dónde:**

c= concentración exacta, en moles por litro, de la solución de ácido clorhídrico.

m= Masa, en gramos, de la porción de prueba.

V<sub>0</sub>= Volumen, en mililitros, de la solución de ácido clorhídrico utilizado en el blanco de prueba.

V<sub>1</sub>= volumen, en mililitros, de solución de ácido clorhídrico utilizada en la determinación.



El contenido de compuestos carbonílicos, expresado como un aldehído o cetona específico como un porcentaje de masa, está dado por la fórmula:

$$M_r \times \frac{(V_0 - V_1) \times c}{m}$$

**Dónde:**

$M_r$  = Masa molecular relativa del aldehído o cetona estipulado en la monografía específica del aceite esencial en particular.

$c$ ,  $m$ ,  $V_0$  y  $V_1$  tienen los mismos significados que arriba.

Expresar el resultado a dos cifras significativas.

### **MGA 0991. Volumetría**

**Titulación directa.** Una titulación directa implica la valoración de un analito presente en una solución con un agente valorante (SV), el cual se va adicionando gradualmente hasta que la reacción se completa.<sup>(8)</sup>

El punto de equivalencia, es el punto donde la cantidad de valorante adicionado es exactamente la necesaria para que el valorante reaccione estequiométricamente con el analito, sin embargo, éste es el resultado ideal, lo que en realidad se mide es el punto final, el cual se observa por un cambio brusco de una propiedad física de la disolución. El punto final puede ser determinado electrométricamente por medio de un medidor potenciométrico, o visualmente si se usa un indicador apropiado.<sup>(8)</sup>

La SV se selecciona respecto a su normalidad, de tal manera que el volumen agregado, por medio de una bureta graduada, sea entre el 30 por ciento y el 100 por ciento de la capacidad nominal de la bureta.<sup>(8)</sup>

**Nota:** Cuando se requiere menos de 10 mL de solución valorada, se deberá utilizar una microbureta. Cuando el punto final se aproxima, la solución volumétrica se agrega gota a gota, hasta que la última adición corresponda al punto final. La cantidad de sustancia contenida en la solución muestra, se calcula de acuerdo con el volumen utilizado, tomando en cuenta la normalidad de la solución volumétrica y el factor de equivalencia de la sustancia, dado en la monografía respectiva.<sup>(8)</sup>

**Titulaciones residuales.** En algunas titulaciones se requiere agregar un exceso medido de la solución volumétrica, sobre el volumen calculado, necesario para reaccionar con la sustancia por valorar. El exceso se titula con una segunda solución

volumétrica, lo que constituye propiamente la titulación residual, que es conocida también como titulación por retroceso. La cantidad de sustancia contenida en la solución muestra, se calcula tomando en cuenta: a) la diferencia entre el volumen de la solución volumétrica agregada previamente y el volumen de la segunda solución volumétrica, empleado en la retrotitulación; b) las normalidades de las dos soluciones volumétricas y c) el factor de equivalencia de la sustancia, dado en la monografía respectiva. En muchos análisis se especifica que es necesario efectuar una prueba en blanco, con los mismos reactivos, que se tratan en la misma forma que la muestra. En tales pruebas, el volumen de la solución volumétrica usado en la titulación, equivalente a la sustancia que ha sido valorada, se le sustrae el volumen empleado en la titulación de la prueba en blanco, obteniendo así el utilizado en la titulación de la muestra. Con el volumen corregido así obtenido, se calcula la cantidad de la muestra, tomando en cuenta los valores antes mencionados, de la manera indicada. Las titulaciones más comunes están basadas en reacciones ácido-base, óxido-reducción, formación de complejos y precipitación.<sup>(8)</sup>

**Titulaciones complejométricas.** La formación de complejos puede servir como base para la titulación de iones metálicos en las que el titulante es un agente complejante, por lo que las titulaciones complejométricas son útiles para determinar un gran número de metales. Se puede lograr selectividad mediante el control del pH, ya que la mayoría de los agentes complejantes son ácidos o bases débiles cuyos equilibrios están influidos por el pH y también mediante el uso adecuado de agentes enmascarantes (otros agentes complejantes que reaccionan con los iones metálicos que causan la interferencia).<sup>(8)</sup>

En una titulación complejométrica se puede detectar el punto final en forma potenciométrica si se dispone de un electrodo adecuado, o mediante el uso de un indicador; los indicadores que se usan en titulaciones complejométricas son en sí mismos agentes quelantes, sin embargo, el complejo metal-indicador debe ser menos estable que el complejo metal-titulante. La reacción entre el metal y el indicador debe ser rápida y reversible, cuando la reacción no sea suficientemente rápida, puede efectuarse una titulación residual.<sup>(8)</sup>

Un indicador es útil solo para titulaciones de aquellos metales que forman un complejo más estable con el titulante que con el indicador al pH en el cual debe llevarse a cabo la reacción. Se describen a continuación los procedimientos de valoración de algunos cationes.<sup>(8)</sup>

## **Aluminio**

**Método I.** Utilizar este método a menos que se especifique otra cosa en la monografía correspondiente. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL 20 mL

de la solución especificada, agregar 25 mL de una solución de edetato disódico 0.1 M y 10 mL de una mezcla de acetato de amonio al 15.5 por ciento (m/v): ácido acético 2M (1:1). Calentar a ebullición durante 2 min, enfriar y agregar 50 mL de etanol absoluto y 3 mL de una solución de ditizona al 0.025 por ciento (m/v) en etanol absoluto recientemente preparada. Titular el exceso de la solución de edetato disódico con SV de sulfato de zinc 0.1 M hasta que haya un cambio de azul verdoso a violeta rojizo. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.1 M equivale a 2.698 mg de aluminio.<sup>(8)</sup>

**Método II.** Disolver la cantidad especificada de la sustancia que se va a examinar en una mezcla de 2 mL de solución de ácido clorhídrico 1M y 50mL de agua, agregar 50mL de solución de edetato disódico 0.05M y neutralizar con solución de hidróxido de sodio 1M, utilizando rojo de metilo como indicador. Calentar la solución a ebullición y mantener por lo menos 10 min en el baño de agua hirviendo, enfriar, añadir 50mg de anaranjado de xilenol triturado y 5 g de hexamina. Titular el exceso de la solución de edetato disódico 0.05M con SV de nitrato de plomo 0.05M hasta que la solución se torne rosa-violeta. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.05M equivale a 1.349 mg de aluminio.<sup>(8)</sup>

## **Bismuto**

**Método I.** Utilizar este método a menos que se especifique otra cosa en la monografía correspondiente. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL la solución especificada y diluir a 250 mL con agua, o el disolvente indicado en la monografía, añadir con agitación gota a gota solución de hidróxido de amonio 13.5M, hasta que se observe opalescencia. Añadir 0.5 mL de ácido nítrico concentrado y calentar a 70°C, manteniendo la solución a esta temperatura hasta que la solución se vuelva completamente clara. Añadir 50 mg de la mezcla de anaranjado de xilenol triturado y titular con SV de edetato disódico 0.1M hasta e color cambie de violeta rosado a amarillo. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.1M equivale a 20.90mg de bismuto.<sup>(8)</sup>

**Método II.** Disolver la cantidad especificada de la sustancia por analizar en el menor volumen posible de una solución de ácido nítrico 2M, agregar 50mL de agua y ajustar el pH entre 1 y 2, añadiendo gota a gota con agitación una solución de ácido nítrico 2M o una solución de hidróxido de amonio 5m según e requiera. Agregar 50 mg de anaranjado de xilenol triturado y titular con una SV de edetato disódico 0.05 M hasta que el color cambie de rosa-violeta a amarillo. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.05 M equivale a 10.45 mg de bismuto.<sup>(8)</sup>

## **Calcio**

**Método I.** Utilizar este método a menos de que se especifique otra cosa en la monografía correspondiente. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL la solución especificada y diluir a 300 mL con agua, añadir 6 mL de una solución de hidróxido de sodio 10 M y 15 mg de ácido calcona-carboxílico triturado y titular con una SV de edetato disódico 0.1 M hasta que el color cambie de violeta a azul. Cada mililitro de la solución de edetato disódico equivale a 4.008 mg de calcio.<sup>(8)</sup>

**Método II.** Disolver la cantidad especificada de la sustancia por analizar en pocos mililitros de agua, acidificar si es necesario con ácido clorhídrico 2 M y diluir con agua a 50 mL. Titular con Sv de edetato disódico 0.05 M hasta estar cerca del punto final esperado, añadir 4 mL de solución de hidróxido de sodio 10 M y 0.1 g de ácido calcona-carboxílico triturado y continuar la titulación hasta que el color cambie de rosa a azul. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.05 M equivale a 2.004 mg de calcio.<sup>(8)</sup>

## **Magnesio**

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL la solución especificada y diluir a 300 mL con agua o disolver la cantidad de sustancia por analizarse en 5 mL a 10 mL de agua o en el mínimo posible de solución de ácido clorhídrico 2 M y diluir a 50 mL con agua. A la solución restante agregar 10 mL de SA de hidróxido de amonio pH 10 y 50 mg de negro mordente 11 triturado. Calentar a 40°C y titular a esta temperatura con SV de edetato disódico 0.1 M, hasta que el color cambie de violeta a azul. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.1 M equivale a 2.431 mg de magnesio.<sup>(8)</sup>

## **Plomo**

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL la solución especificada y diluir con agua a 200 mL, o disolver la cantidad de sustancia por analizarse en 5 mL a 10 mL de agua o en el mínimo posible de solución de ácido acético 5M y diluir a 50 mL con agua. A la solución resultante añadir 50 mg de anaranjado de xilenol, añadir suficiente hexamina para producir una coloración violeta-rosado. Titular ya sea con SV de edetato disódico 0.05 M o 0.1 M según lo requiera la monografía correspondiente, hasta que el color cambie a amarillo. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.1 M equivale a 20.72 mg de plomo.<sup>(8)</sup>

## **Zinc**

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL la solución especificada y diluir a 200 mL con agua o disolver la cantidad de sustancia por analizar en la cantidad en la cantidad indicada de solución de ácido acético 2 M y diluir a 50 mL con agua. Agregar 50 mg de anaranjado de xilenol triturado y suficiente hexamina para producir una coloración rosa-violeta, agregar un exceso de 2 g de hexamina y titular con SV de edetato disódico 0.05 M o 0.1 M según se especifique en la monografía correspondiente, hasta que el color cambie a amarillo. Cada mililitro de la solución de edetato disódico 0.1 M equivale a 6.54 mg de zinc.<sup>(8)</sup>

### **Titulaciones en disolventes no acuosos.**

Los ácidos y las bases se han definido como sustancias que, al ser disueltas en agua, liberan iones hidrógeno o hidroxilo, respectivamente. Esta definición, introducida por Arrhenius, no reconoce el hecho de que las propiedades características de los ácidos y bases, pueden desarrollarse también en otros disolventes. La definición de Bronsted, más generalizada, indica que un ácido es una sustancia que libera protones y que una base es una sustancia que acepta protones. La definición de Lewis es aún más amplia, según la cual el ácido es una sustancia que acepta un par electrónico y la base es aquella que dona un par electrónico. Define la neutralización como la formación de un enlace covalente coordinado entre un ácido y una base.<sup>(8)</sup>

La potencia aparente de un ácido o de una base, se determina por la magnitud de sus reacciones con el disolvente. En soluciones acuosas, todos los ácidos fuertes reaccionan con el disolvente, disociándose casi completamente. En un disolvente protofilico débil tal como el ácido acético, el grado de protonación del disolvente, muestra que la fuerza de los ácidos en orden decreciente es: perclórico, bromhídrico, sulfúrico, clorhídrico y nítrico.<sup>(8)</sup>

El ácido acético no se disocia completamente en el agua para formar un ión hidronio y es por lo tanto, un ácido débil. En cambio, disuelto en una base tal como etilendiamina, reacciona completamente, comportándose como un ácido fuerte. El mismo efecto se observa con el ácido perclórico.<sup>(8)</sup>

Este efecto nivelador se observa también para las bases. En ácido sulfúrico, casi todas las bases parecen tener la misma fuerza. Como las propiedades del disolvente disminuyen en la serie: ácido sulfúrico, ácido acético, fenol, agua, piridina y butilamina, las bases llegan a ser progresivamente más débiles hasta que pierden sus propiedades básicas. Las bases fuertes son en orden decreciente: 2-amino-etóxido de sodio, metóxido de potasio, metóxido de sodio y metóxido de litio.<sup>(8)</sup>

Muchos compuestos insolubles en agua, cuando se disuelven en disolventes orgánicos, acentúan sus propiedades ácidas o básicas, por lo que, seleccionando

un disolvente apropiado, se pueden valorar mediante titulación no acuosa. Además, si se selecciona adecuadamente el disolvente y la solución volumétrica para la titulación es posible valorar frecuentemente la parte fisiológicamente activa de un compuesto. Los compuestos puros de las preparaciones farmacéuticas se pueden titular directamente, aunque a menudo es necesario aislar el ingrediente activo de los aditivos que pueden interferir.<sup>(8)</sup>

Los compuestos que pueden titularse como ácidos, incluyen los siguientes: ácidos halogenados, anhídridos ácidos, grupos carboxílicos ácidos, aminoácidos, enoles, (tales como barbituratos y xantinas), imidas, fenoles, pirroles y sulfonamidas.<sup>(8)</sup>

Los compuestos que se pueden titular con bases incluyen: aminas, compuestos heterocíclicos, que contienen nitrógeno, oxazolinas, compuestos cuaternarios de amonio, sales alcalinas de ácidos orgánicos, sales alcalinas de ácidos inorgánicos débiles y algunas sales de aminas. Numerosas sales de ácidos halogenados se pueden titular disolviéndolas en ácido acético o anhídrido acético, después de agregar acetato de mercurio, el cual separa el ión haluro, como un complejo haluro-mercurio, sin ionizar, e introduce el ión acetato.<sup>(8)</sup>

Para titular un compuesto básico se emplea de preferencia, una solución volumétrica de ácido perclórico en ácido acético glacial, aunque en casos especiales, se emplea la solución de ácido perclórico en dioxano. El sistema de electrodos vidrio-calomel es útil en este caso.<sup>(8)</sup>

En la titulación de un compuesto de carácter ácido, se prefiere una solución volumétrica de metóxido de sodio, en una mezcla de metanol y tolueno. La solución de metóxido de litio en el sistema de disolventes metanol-benceno, se puede utilizar para titular aquellos compuestos que producen un precipitado gelatinoso, cuando se titulan con metóxido de sodio.<sup>(8)</sup>

El error alcalino limita el uso del electrodo de vidrio, como un electrodo indicador en conjunto con soluciones titulantes de álcali-metal-alcóxido, particularmente en disolventes básicos. Por lo que el electrodo indicador de antimonio a pesar de tener cierto comportamiento errático suele utilizarse en estas titulaciones. El uso de compuestos de sales de hidróxidos cuaternarios de amonio, p. ej. Hidróxido de tetra-*n*-butilamonio e hidróxido de trimetil-hexadecilamonio (en benceno-metanol o alcohol isopropílico) tiene dos ventajas sobre los otros titulantes: (a) la sal de tetraalquilamonio del ácido titulado es soluble en el medio de titulación y (b) se puede usar el electrodo de calomel/vidrio, el cual es más estable y conveniente para efectuar las titulaciones potenciométricas.<sup>(8)</sup>

Los disolventes para compuestos ácidos no deben exponerse prolongadamente al aire atmosférico, para protegerlos de la acción del dióxido de carbono. Para ello se

utiliza una cubierta adecuada o se emplea atmósfera inerte durante la titulación. La absorción del dióxido de carbono se puede determinar efectuando una titulación en blanco, en la cual generalmente el volumen gastado es menor o igual que 0.01 mL de la solución de metóxido de sodio 0.1 N, por mililitro de disolvente. El punto final se determina ya sea visualmente mediante el cambio de coloración producida por el indicador empleado o potenciométricamente, según se indique en la monografía respectiva. En las titulaciones que se emplean disolventes ácidos, si se utiliza un electrodo de referencia de calomel, es recomendable sustituir el puente salino de solución acuosa sobresaturada de cloruro de potasio, con una solución de perclorato de litio 0.1 N, en ácido acético glacial o bien con solución de cloruro de potasio en metanol, en las titulaciones en que se emplean disolventes de carácter básico.<sup>(8)</sup>

Cuando en las monografías respectivas se recomienda la modificación del electrodo de calomel, con esta o con otras mezclas no acuosas, es necesario primero quitar la solución de cloruro de potasio y el cloruro de potasio residual, lavando con agua, después eliminar el agua residual lavando con el disolvente no acuoso adecuado y finalmente llenar el electrodo con la mezcla no acuosa indicada.<sup>(8)</sup>

### **Procedimientos recomendados**

**Nota:** La unión entre el electrodo de calomel y el líquido titulante debe tener una resistencia eléctrica razonablemente baja y con un mínimo de transferencia de líquido de un lugar a otro. Es recomendable seguir las indicaciones del fabricante para la instalación de los electrodos a fin de evitar la inestabilidad del sistema.<sup>(8)</sup>

### **Método A (Para bases y sus sales)**

Preparar una disolución de la sustancia problema conforme se indica en la monografía individual o disolver la sustancia problema en un volumen apropiado de ácido acético glacial previamente neutralizado utilizando SI de cristal violeta/ácido acético, calentar si es necesario y enfriar. Correr paralelamente un blanco de reactivos. Cuando la sustancia es una sal de hidrácido halogenado, agregar 15 mL de solución SR de acetato de mercurio/ácido acético. Agregar 2-3 gotas de SI cristal violeta/ácido acético y titular con SV ácido perclórico de la concentración indicada en la monografía correspondiente.<sup>(8)</sup>

Cuando el punto final se determina potenciométricamente se usa un electrodo de vidrio y como referencia un electrodo de calomel saturado (conteniendo cloruro de potasio 350g/L). Cuando la temperatura a la cual se efectúa la titulación ( $t_2$ ) difiere de la temperatura a la cual se valoró el titulante ( $t_1$ ), se deberá corregir el volumen obtenido multiplicándolo por  $(1+0.001(t_1-t_2))$ . Calcular el resultado del ensayo con el volumen corregido.<sup>(8)</sup>

## **Método B (para ácidos)**

El titulante, el disolvente y el indicador (si se utiliza) para cada sustancia son especificados en la monografía individual. Se debe proteger la solución problema del dióxido de carbono de la atmósfera durante la determinación. Puede resultar conveniente sustituir la capa superior de aire del líquido de la titulación por nitrógeno.<sup>(8)</sup>

Disolver la sustancia problema en un volumen apropiado del disolvente previamente neutralizado al indicador utilizado, calentar si es necesario y enfriar o bien preparar la solución como se especifica la monografía individual. Titular hasta vire del indicador. Correr un blanco y hacer las correcciones necesarias. El titulante debe estandarizarse utilizando el mismo disolvente e indicador usados en la valoración de la muestra.<sup>(8)</sup>

Cuando el punto final se localice potenciométricamente se omite el indicador y la estandarización del titulante se efectúa también potenciométricamente.<sup>(8)</sup>

Se utiliza entonces un electrodo de vidrio y en el electrodo de referencia de calomel saturado el cloruro de potasio 350 g/L se sustituye por cloruro de potasio en metanol.<sup>(8)</sup>

**Detección del punto final de una titulación con indicadores o potenciométricamente.** El uso de indicadores es el método más sencillo y conveniente para determinar el punto final en una valoración, en general se elige un indicador cuyo intervalo de transición coincida con el salto de la curva de valoración lo mejor posible así, debido a que estas sustancias químicas usualmente coloridas, responden a los cambios en las condiciones de la solución antes y después del punto de equivalencia con variaciones de color que pueden ser detectadas visualmente, como el punto final de la reacción, se puede obtener un estimado confiable del punto de equivalencia, minimizando el error de valoración.<sup>(8)</sup>

Otro método útil para determinar el punto final de una titulación, resulta ser el uso de mediciones electroquímicas. Cuando se sumerge en un sistema volumétrico dos electrodos, uno de ellos sensible a la variación de la concentración de los compuestos sujetos a la reacción volumétrica y el otro electrodo de referencia, cuyo potencial es insensible a cualquier compuesto disuelto, se forma una celda galvánica y la diferencia de potencial entre los dos electrodos pueden ser medida mediante un potenciómetro que permite seguir el curso de la reacción. Cuando las lecturas potenciométricas se grafican (para una valoración ácido-base, pH contra mililitros de la solución titulante añadida; para una valoración por precipitación, complejométrica o de óxido-reducción, milivoltios contra mililitros del titulante añadido), resulta una curva sigmoidea con una sección de cambio rápido en la



cercanía del punto de equivalencia. El punto medio de esta porción lineal vertical o punto de inflexión puede ser tomado como punto final.<sup>(8)</sup>

Un método adecuado para estimar el punto final cuando resulta poco práctico utilizar indicadores visuales consiste en representar la primera o segunda derivada de la curva de calibración. La pendiente de una curva de valoración alcanza su valor máximo en el punto de inflexión, por tanto, la primera derivada de una curva de valoración muestra un máximo en el punto final de la valoración. La primera derivada se calcula en forma aproximada por el  $\Delta\text{pH}/\Delta V$ , donde  $\Delta\text{pH}$  es el cambio entre adiciones sucesivas de agente valorante.<sup>(8)</sup>

**Nota:** Cuando la curva se haya trazado con milivoltios vs mililitros, la primera derivada se calcula como  $\Delta\text{mv}/\Delta V$ .<sup>(8)</sup>

La segunda derivada de una curva de valoración puede ser más útil que la primera, ya que el punto final viene indicado por su intersección con el eje del volumen. El punto final corresponde al volumen en el que la segunda es cero.<sup>(8)</sup>

La segunda derivada se calcula a partir de  $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta V) / \Delta V$  o bien  $[\Delta(\Delta\text{mv}/\Delta V) / \Delta V]$  cuando la señal sea en milivoltios.<sup>(8)</sup>

Existen dos tipos de tituladores electrométricos automáticos, el primero es un equipo que adiciona el titulante automáticamente y registra en un graficador las diferencias de potencial durante el curso de la valoración, dando la curva sigmoidea esperada. En el segundo tipo la adición del titulante se realiza automáticamente hasta que se alcanza un pH o potencial preestablecido, que corresponde al punto final y en ese momento cesa la adición del titulante.<sup>(8)</sup>

La detección del punto final por medios potenciométricos puede ser usada en determinaciones volumétricas ácido-base, en sustitución de un indicador recomendado a menos que se indique otra cosa en la monografía individual.<sup>(8)</sup>

En la tabla 17 se resumen algunos sistemas de electrodos recomendables para las titulaciones potenciométricas.<sup>(8)</sup>

**Tabla 17.-Sistemas para titulaciones no acuosas**

Tipos de disolvente	De carácter ácido (Titulaciones de ácidos y sus bases)	Relativamente neutro (Titulación diferencial de bases)	De carácter básico (Titulación de ácidos)	Relativamente neutro (Titulación diferencial de ácidos)
<b>Disolvente</b> <sup>(1)</sup>	Ácido acético glacial	Acetonitrilo	Dimetilformamida	Acetona
	Anhidrido acético	Alcoholes	N-Butilamina	Acetonitrilo

	Ácido fórmico	Cloroformo	Piridina	Metiletilcetona
	Ácido propiónico	Benceno	Etilendiamina	Metil isobutil cetona
	Cloruro de sulfurilo	Clorobenceno	Morfolina	Alcohol terbutílico
		Acetato de etilo		
		Dioxano		
<b>Indicadores</b>	Cristal violeta	Rojo de metilo	Azul de timol	Violeta azo
	Rojo quinaldina	Anaranjado de metilo	Violeta azo	Azul de bromo timol
	Alfezurina 2-G	<i>p</i> -Naftolbenceína	Timolftaleína	<i>p</i> -Hidroxiazo-benceno
	Verde malaquita		Rojo quinaldina	Azul de timol
	<i>p</i> -Naftolbenceína		<i>o</i> -Nitroanilina <i>p</i> -Hidroxiázobenceno	
<b>Electrodos</b>	Vidrio/Calomel	Vidrio/Calomel	Antimonio/Calomel	Antimonio/Calomel
	Vidrio/Plata-Cloruro de plata	Calomel/Plata-cloruro de plata	Antimonio/Vidrio	Vidrio/calomel
	Mercurio-Acetato mercurio		Antimonio/Antimonio <sup>(2)</sup>	Vidrio/Platino <sup>(2)</sup>
			Platino/calomel	
			Vidrio/Calomel	

<sup>1</sup>Los disolventes relativamente neutros de baja dieléctrica, tales como benceno, cloroformo o dioxano pueden emplearse junto con algún disolvente de carácter ácido o básico, a fin de aumentar la sensibilidad del punto final de la titulación.

<sup>2</sup>En la solución titulante

**Tabla 18.- Sistema de electrodos para titulaciones potenciométricas**

Titulación	Electrodo indicador	Ecuación <sup>(1)</sup>	Electrodo de referencia	Aplicaciones <sup>(2)</sup>
<b>Ácido-base</b>	Vidrio	$E = k + 0.0591 pH$	Calomel o Plata-Cloruro de plata	Titulación de ácidos y bases
<b>Por precipitación (plata)</b>	Plata	$E = E^0 + 0.0591 \log[Ag^+]$	Calomel con puente salino de nitrato de potasio	Titulación con/o plata involucrando haluros o tiocianato
<b>Complejometría</b>	Mercurio-mercurio (II)	$E = E^0 + 0.0296 (\log K' - pM)$	Calomel	Titulación de varios metales: Mg <sup>+2</sup> , Ca <sup>+2</sup> , Al <sup>+3</sup> , Bi <sup>+3</sup> con EDTA
<b>Óxido-reducción</b>	Platino		Calomel o Plata-Cloruro de plata	Titulación con arsenito, bromo, cerato, dicromato, hexacianoferrato

(III), iodato, nitrito,  
permanganato y  
tiosulfato.

<sup>1</sup>Forma apropiada de la ecuación de Nernst que describe el sistema indicado de electrodos: K = constante del electrodo de vidrio; K' = constante derivada del equilibrio mercurio-mercurio II-EDTA; M = cualquier metal valorado con EDTA; (ox) y (red) de la ecuación,  $ox + ne \rightleftharpoons red$ .

<sup>2</sup>La lista es representativa, pero no exhaustiva.

**Calibración con el blanco de reactivos.** Como se mencionó anteriormente, el punto final determinado en un análisis volumétrico, es un estimado del punto de equivalencia de reacción, ya que la validez de este estimado depende, de entre otros factores, de la naturaleza de los componentes de la solución por valorar y de la concentración de la solución titulante. De tal manera que, para aumentar la confiabilidad de la determinación del punto final del análisis volumétrico, se hace necesario corregir con un blanco apropiado. Esta corrección es usualmente obtenida por medio de la titulación residual del blanco, donde el procedimiento requerido se repite con todo detalle a excepción de la sustancia por analizar que es omitida. En tales casos el volumen de la solución titulante equivalente a la sustancia analizada, es la diferencia entre el volumen consumido en la titulación residual del blanco y el consumido en la titulación de la sustancia en análisis. El volumen así obtenido se utiliza en el cálculo de la cantidad de sustancia valorada, de la misma manera que como se indica en la parte correspondiente a valoraciones residuales. Cuando se hace la valoración por el método potenciométrico la corrección del blanco es normalmente insignificante.<sup>(8)</sup>

En la tabla 17 se indican los sistemas más utilizados en la titulación con disolventes no acuosos.<sup>(8)</sup>

### Anexo 3.- Glosario

**Absorción:** Proceso mediante el cual una sustancia retiene moléculas de otra que se encuentran en estado líquido o gaseoso.

**Aceite esencial:** Constituye el material formado por compuestos volátiles contenidos en las plantas, obtenidos por destilación (arrastre por vapor, hidrodestilación), por maceración, maceración en frío con aceites fijos, extracción con disolventes volátiles o por medios mecánicos (expresión). Los aceites esenciales para uso interno deben de ser obtenidos exclusivamente por destilación o por compresión.

**Adsorción:** Atracción y retención que realiza un cuerpo en su superficie de iones, átomos o moléculas, que pertenecen a un cuerpo diferente.

**Analito:** Es el componente de la muestra cuya concentración se busca en un análisis químico.

**Anticonvulsivos:** Medicamento u otras sustancias que se usa para prevenir o interrumpir las crisis epilépticas o convulsiones.

**Antiséptico:** Sustancias antimicrobianas que se aplican a un tejido o sobre la piel para reducir la posibilidad de infección.

**Droga vegetal:** Parte de una planta, generalmente desecada utilizada con fines medicamentosos o industriales.

**Blanco:** En cromatografía mide la respuesta del procedimiento sin analito.

**Carmitiva:** Medicamento o sustancia que favorece la disminución de la generación de gases en el tubo digestivo.

**Cromatograma:** Diagrama donde se representan los resultados de la separación mediante técnicas cromatográficas.

**Expectorante:** Provoca o promueve la expulsión de las secreciones bronquiales acumuladas.

**Factor de capacidad:** Relaciona volúmenes o tiempos de retención de un componente respecto a la fase móvil.

**Factor de selectividad:** Relación entre los tiempos de retención de los dos componentes.

**Fase estacionaria:** En cromatografía consiste en partículas, generalmente sólidas, pequeñas y con una superficie microporosa, puede estar empaquetada o en forma de columna o extendida en forma de capa.

**Fase móvil:** En cromatografía puede ser un líquido o un gas, transporta a los componentes de la mezcla a través del sistema cromatográfico.

**Fenoles:** Compuestos orgánicos aromáticos que contienen el grupo hidroxilo como su grupo funcional, su fórmula es  $C_6H_6O$

**Flavonoides:** Metabolitos secundarios polifenólicos comúnmente con un grupo cetona y normalmente pigmentos de coloración amarilla.

**Materia extraña:** Es el material consistente de cualquier o de todos los siguientes:

- Partes de las plantas medicinales original o cualquier otro material diferente al nombrado o especificado.
- Cualquier organismo, parte o producto del mismo, diferente a los nombrados en la definición y en la descripción de la droga.
- Mezclas adicionales de minerales adheridos a los materiales de las plantas medicinales tales como piedras, tierra, arena y polvo.

**Muestra:** Parte o proporción de un producto que permite conocer la calidad del mismo.

**Sanitizar:** Proceso de limpieza que reduce, pero no necesariamente elimina los microorganismos del medio ambiente y las superficies. Reducen el número de microorganismos a un nivel seguro.

**Sedante:** Sustancia que se usa para calmar a una persona, aliviar la ansiedad o ayudar a dormir.

**Separación:** Se usa para transformar una mezcla de sustancias en dos o más productos distintos.

**Solución:** Mezcla homogénea de dos o más sustancias disueltas en otra sustancia en mayor proporción.

**Taninos:** Compuesto fenólico que abunda en muchas plantas y frutos. Son hidrosolubles, de sabor áspero y amargo. Su composición es  $C_{14}H_{14}O_{11}$ .

**Terpenos:** Hidrocarburos complejos de forma general  $C_nH_{2n-4}$ , de la serie del isopreno que está formado por dos dobles enlaces y que unidos por cadenas orgánicas forman un grupo de compuestos con características propias y que

determinan la variedad de los efectos terapéuticos que se presentan en las plantas que lo contienen.

**Terpinenos:** Son tres hidrocarburos isoméricos que se clasifican como terpenos.

#### Anexo 4.- Glosario herbolario

**Avaxial:** Referente a la superficie inferior de las hojas; el envés.

**Acuminada:** Hoja cuya extremidad termina en una punta aguda o larga.

**Adaxial:** Término usado para indicar la superficie superior de las hojas; el haz.

**Adnata:** Sinónimo de adherente o concrecente.

**Aerífera:** Que lleva o contiene aire.

**Alveolado:** Con depresiones en forma de panal.

**Anastomosan:** Que se caracterizan por tener dos o más nervios que se vuelven a unir.

**Anisocítica o anisófila:** Planta con hojas desiguales en una misma rama.

**Antera:** Parte apical del estambre, más o menos abultada, que contiene el polen.

**Anticlinal:** Referente a la superficie de referencia.

**Anular:** En forma de anillo.

**Aovado:** Órgano cuyo contorno recuerda la forma de huevo. Sinónimo de ovado.

**Apical:** Parte superior de un órgano.

**Ápice:** Extremo superior o punta de alguna cosa.

**Aquenio:** Fruto seco indehiscente.

**Arilo:** Nombre dado a la excrecencia carnosa de la semilla.

**Atenuado:** Estrechado gradualmente. Se dice cuando el limbo en la hoja se va estrechando en la base.

**Auriculado:** Dícese de lo que tiene forma de oreja.

**Axila:** Fondo del ángulo superior que forma una estructura con el eje caulinar en el que se inserta.

**Baya:** Fruto simple de pulpa carnosa.

**Bienal:** Que sobrevive dos años.

**Bifacial:** Que tiene dos caras.

**Biotopo:** Espacio limitado en el que vive una colectividad de seres vivos.

**Bipinnatisecto:** Hoja u otro órgano pinnatisecto cuyos segmentos alcanzan el nervio medio.

**Borde entero:** Margen de una hoja sin dientes.

**Bráctea:** Hoja que nace del pedúnculo de las flores.

**Bracteóla:** Bráctea secundaria, generalmente sobre el pedicelo.

**Calículo:** Grupo de hojas parecidas a los sépalos localizadas por debajo del cáliz verdadero.

**Cáliz:** Parte de la flor que se encuentra por debajo de la corola.

**Cámbium:** Zona generatriz integrada por células meristemáticas, que produce la xilema y el floema secundarios.

**Campanulado:** En forma de campana.

**Capitado:** En forma de cabeza.

**Capítulo:** Flores sésiles sobre un receptáculo. Sinónimo: cabezuela.

**Caulinares:** Disposición sobre el tallo.

**Cavidad esquizógena:** Canal que se forma por la división de células que rodean un espacio entre células preexistente. Por él pueden pasar sustancias como mucílagos, resinas, látex y otros.

**Célula pétreo:** Nombre dado a un tipo celular de esclerénquima.

**Cerda:** Estructura a manera de pelo largo y rígido.

**Ciliado:** Órgano provisto de pelos marginales.

**Cima:** Inflorescencia definida que remata en una flor.

**Colénquima:** Tejido formado por células vivas con paredes gruesas, sin espacios entre células. Tiene como función dar resistencia a los órganos en desarrollo, se presenta principalmente en tallos y hojas.

**Conoide:** Con forma de cono.

**Corcho:** Tejido vegetal constituido por células en las que la celulosa de su membrana ha sufrido una transformación química y ha quedado con vertida en suberina.



**Coriáceo:** De consistencia como el cuero.

**Corimbo:** Inflorescencia en la que los pedúnculos florales nacen en distintos puntos de aquella y terminan aproximadamente a la misma altura.

**Córnea:** De consistencia dura como el cuero.

**Corola actinomorfa:** Corola regular. La que queda dividida en dos partes simétricas por todos los planos que pasan por el eje de la flor y por la línea media del pétalo.

**Corola cigomorfa:** Corola irregular. La que no queda dividida en dos partes simétricas por todos los planos que pasan por el eje de la flor y por la línea media del pétalo.

**Corona:** Conjunto de apéndices que se originan entre los estambres y la corola.

**Cristales:** Nombre proporcionado a los depósitos orgánicos, de acuerdo a la forma de precipitado y se conocen como drusas, rafidios, gránulos de aleurona.

**Cuneado:** En forma de cuña.

**Cunciforme:** Sinónimo de cuneado.

**Cutícula:** Membrana formada por ciertas sustancias que segrega el protoplasma, las cuales, acumulándose en la periferia de la célula, constituyen una cubierta protectora de está.

**Dehiscente:** Fruto cuyo pericarpo se abre naturalmente para que salga la semilla.

**Dicótomo:** Órgano que se divide o se bifurca en dos.

**Dimorfo:** Que tiene dos formas.

**Drusas:** Asociación de cristales generalmente de carbonato de calcio, con apariencia de una estrella.

**Envés:** Superficie inferior de la hoja.

**Epidermis:** Constituida por diferentes tipos celulares, que conforman la capa externa de los órganos de la planta. Su función es de protección y de transpiración. En vista superficial se observan formas celulares que presenta la epidermis como son: prismáticas, fusiformes, rectangulares entre otras.

**Equinulado:** Armado de púas débiles y pequeñas.

**Escarioso:** Se aplica a los órganos de los vegetales de hojas secas, que son delgados y semitransparentes.

**Esclereidas:** Células duras.

**Esclerénquima:** Tejido muerto formado por células con paredes engrosadas y duras. Tiene como función proporcionar resistencia a las plantas. Está constituido por dos tipos de células; las fibras o macrosclereidas y esclereidas.

**Estambres:** Órgano masculino de las flores.

**Estigma:** Parte apical del pistilo que recibe el polen.

**Estípula:** Apéndice foliáceo colocado en los lados del pecíolo o en el ángulo que esté forma con el tallo.

**Estoma:** Estructura microscópica en la superficie de la epidermis de las hojas y tallos que regula el paso de los gases entre la planta y el exterior y está rodeada por dos células de guarda.

**Exina:** Membrana externa del grano de polen.

**Falciforme:** En forma de una hoz.

**Filamento:** Parte estéril del estambre que sostiene la antera.

**Fitomelano:** Sustancia de color negro de algunos compuestos.

**Flavelo:** Abanico.

**Flexuoso:** Que forma ondas.

**Floema:** Tejido de conducción, constituido por diferentes tipos celulares como las células conductoras de productos fotosintéticos llamados células cribosas, células acompañantes y parenquimáticas. El floema se diferencia en primario cuando se produce por la acción de las células del procámbium en los órganos de crecimiento en grosor.

**Flor capitular:** Flor de la familia de las compuestas o asteráceas.

**Flor hermafrodita:** Flor que tiene androceo y gineceo.

**Flor ligulada:** Flor que tiene un pétalo en forma de lengüeta llamado lígula.

**Florescencia:** Momento en que abre la flor.

**Flósculo:** Flor pequeña tubular que forma parte de un capítulo o cabezuela.

**Foliolo:** Cada una de las hojuelas de la hoja compuesta.

**Friable:** Que se desmenuza fácilmente.

**Fusiforme:** De forma de huso.

**Gamopétalo:** Flor con los pétalos unidos.

**Gamosépalo:** Cáliz con los sépalos unidos.

**Glabro:** Desprovisto de pelos y glándulas.

**Glaucos:** Verde azulado.

**Granos de almidón:** Cada una de las partículas que almacenan almidón.

**Gránulos de aleurona:** Cristales de oxalato de calcio que se forman en las células epidérmicas, con apariencia de prismas.

**Haz:** Superficie superior de la hoja.

**Haz vascular:** Referido a un conjunto de elementos conductores (floema y xilema) que forman uno o varios paquetes; localizados después de la corteza y antes de la médula en tallos y raíces, en hojas se encuentran cerca del mesófilo.

**Hemisférico:** De forma de hemisferio.

**Hendido:** Dícese de la lámina de la hoja que se divide en lóbulos irregulares.

**Heterófila:** Planta con hojas desiguales en forma o tamaño.

**Heterógamo:** Inflorescencia con dos o más tipos de flores.

**Hipodermis:** Nombre proporcionado al tejido localizado debajo de la epidermis de hojas o tallos, formado de tejido esclerenquimático y tiene como función dar soporte mecánico.

**Hipodermo:** Que está o se pone debajo de la piel.

**Hispido:** Que está cubierto de pelo disperso y duro o de púas y espinas.

**Hoja:** Principal órgano fotosintetizador de las plantas.

**Hojuela:** Sinónimo de folíolo.

**Idioblasto:** Células que varían en cuanto a forma y tamaño dependiendo la función que desempeñan.

**Imbricada:** Que está sobrepuesta como las tejas de un tejado.

**Imparipinnado:** Hoja pinnada que termina en folíolo.

**Induvia:** Cada una de las partes florales persistentes y más o menos acrecidas que a veces acompañan al fruto y lo recubren y protegen.

**Involucro:** Conjunto de brácteas que rodean una inflorescencia.

**Isobilateral:** Igual en dos lados.

**Lámina:** Parte ensanchada de las hojas, pétalos y sépalos.

**Lampiño:** Sinónimo de glabro.

**Lanceolado:** En forma semejante al hierro de la lanza.

**Lenticela:** Poro ovalado en la corteza que corresponde a un estoma.

**Ligulado:** Pétalo desarrollado en el borde del capítulo de ciertas compuestas como la margarita.

**Limbo:** Parte laminar de la hoja.

**Lumen:** Unidad de luz.

**Mácula:** Mancha.

**Margen:** Borde u orilla de la lámina foliar.

**Meato:** Cada uno de los diminutos espacios huecos intercelulares que hay entre los tejidos parenquimatosos de las plantas.

**Mesocarpo:** Parte media del pericarpo.

**Mesófilo:** Conjunto de tejidos localizados entre ambas epidermis de la hoja. Se presenta en tres tipos, el unifacial donde el parénquima empalizada no se diferencia del esponjoso, el bifacial donde hay una diferencia clara entre estos dos tipos de parénquima y el equifacial donde se pueden observar parénquima en empalizada tanto en el haz como en el envés.

**Mucronado:** Terminado en punta rígida a manera de espina.

**Multífido:** Hendido en muchos sitios.

**Nervadura:** Conjunto o disposición de los nervios de una hoja.

**Nódulo:** Proyección tuberosa sobre la raíz.

**Oblanceolado:** De la forma lanceolada con el ápice más ancho que la base.

**Oblicuo:** Asimétrico, con dos lados desiguales.

**Oblongo:** Más largo que ancho, la hoja más o menos rectangular.

**Obovado:** En forma de huevo.

**Opérculo:** Pieza generalmente redonda que sirve como tapadera, que sirve para cerrar ciertas aberturas.

**Ovado:** En forma de huevo.

**Ovoide:** En forma de huevo.

**Pálea:** Escama interior de la flor de las gramíneas o una de las escamas presentes en el receptáculo de muchos miembros de la familia *Asteraceae*.

**Panícula:** Cualquier inflorescencia muy ramificada.

**Papila:** Cada una de las prominencias cónicas que tienen ciertos órganos de algunos vegetales.

**Papiloso:** Que tiene papilas.

**Parasítico:** Perteneciente o relativo a los parásitos.

**Parénquima:** Tejido formado por células vivas con paredes delgadas y espacios pequeños o grandes entre las células; se encuentra ampliamente distribuido en los diferentes órganos de las plantas. En la raíz y tallo se localizan en la corteza y la médula almacenando sustancias de reserva o cristales; en la hoja se relaciona como parénquima en empalizada y con el parénquima esponjoso de apariencia laxa que almacena aire, estos dos tejidos forman al mesófilo.

**Parénquima empalizada:** Tejido constituido por uno a tres estratos de células largas.

**Pecíolo:** Parte de la hoja que une al limbo con el tallo.

**Pedicelo:** Soporte individual de una flor que forma parte de una inflorescencia.

**Pedúnculo:** Soporte principal de una inflorescencia entera o una flor solitaria.

**Pelos glandulares:** Glándula epidérmica piliforme.

**Perenne:** Que perdura varios años.

**Perennifolio:** Dícese de los árboles y plantas que conservan su follaje todo el año.

**Perianto:** Envoltura de las partes reproductoras de la flor.

**Periciclo:** Anillo de células no diferenciadas localizadas alrededor del cilindro vascular, sitio de origen de las raíces laterales secundarias.

**Piloso:** Que tiene pelos.

**Pinnada:** Hoja compuesta de hojas distribuidas a lo largo de los lados de un eje central.

**Pistilo:** Unidad del gineceo compuesto del ovario, el estilo y el estigma.

**Pruina:** Recubrimiento semi opaco, superficial, como de cera que presentan las hojas, tallos o frutas de algunos vegetales.

**Pseudonervadura:** Falsa nervadura.

**Pubescencia:** Calidad de pubescente o velloso.

**Pubescente:** Con pelos simples, delgados y rectos.

**Radio:** Eje secundario de una inflorescencia compuesta.

**Rafidios:** Cristales formados de oxalato de calcio, de forma delgada y alargada semejando una aguja.

**Raíz:** Órgano de la planta que tiene como principal función la absorción y conducción de agua y sales minerales. Generalmente subterránea.

**Receptáculo:** Extremo engrosado o ensanchado del pedúnculo, donde se insertan las piezas florales.

**Reticulado:** De figura de redcilla o red.

**Retuso:** Rodeado con una depresión escasa en medio de márgenes convexos.

**Revoluto:** Con los márgenes enrollados hacia abajo.

**Rizoma:** Tallo subterráneo que crece horizontalmente, paralelo a la superficie del suelo.

**Roseta:** Hojas colocadas en la base del tallo en forma de círculo.

**Semi-aplexicaule:** Que abraza o rodea al tallo hasta la mitad.

**Sépalo:** Una pieza o unidad del cáliz.

**Seríceo:** Con tricomas largos y sedosos, generalmente aplicado contra la superficie o eje vertical de referencia, dirigido hacia el ápice de la misma.

**Sésil:** Aplicase al órgano que carece de pedúnculo.

**Simpétalo:** Flor cuya corola está formada por pétalos soldados.

**Suber:** Corcho.

**Suberoso:** Con la textura de corcho.

**Subulado:** Estrecho hacia el ápice, hasta rematar en punta.

**Suculento:** Gruesa, carnosa y jugosa.

**Sumidades:** Formada por las puntas de las ramas terminales con hojas, flores y ocasionalmente frutos.

**Talo:** Cuerpo de las talofitas, equivalente al conjunto de raíz, tallo y hojas de otras plantas.

**Tallo:** Órgano de la planta que tiene como principal función la conducción de agua, sales minerales y productos de fotosíntesis. Porta hojas, flores y frutos. Pueden ser aéreos y subterráneos como; bulbos y rizomas.

**Talofita:** Planta cuyo cuerpo vegetativo es el talo, que puede estar constituido por una sola célula o un conjunto de células dispuestas en forma de filamento, de lámina entre otras. Tipo de estas plantas son las algas.

**Tector:** Pelo tan solo de cobertura, que no es glandular.

**Tegumento:** Tejido que cubre algunas partes de las plantas, especialmente los óvulos y las semillas.

**Tomentoso:** Que tiene pelos largos y muy entrecruzados.

**Traqueida:** Tipo de vaso cerrado, con los tabiques transversales oblicuos y numerosos.

**Tricoma:** Prolongaciones epidérmicas, de formas diversas conocidos como pelos, escamas y papilas.

**Tricotomía:** Trifurcación de un tallo o una rama.

**Tripinnatisecto:** Expresa que cada lóbulo de hojas se vuelve a dividir.

**Tubérculo:** Tallo subterráneo, rico en sustancias de reserva.

**Tuberosa:** Raíz suculenta parecida a un tubérculo.

**Umbela:** Grupo de flores que nacen en un mismo punto del tallo y se elevan a igual o casi igual altura.

**Vesícula:** Ampolla llena de aire en forma de vejiga.

**Vilano:** Apéndice de pelos o filamentos que corona el fruto de muchas plantas compuestas y le sirve para ser transportado por el aire.

**Xilema:** Tejido de conducción de la mayor parte del agua y de las sustancias minerales.



## Anexo 5.- Abreviaturas

% Porcentaje

± Más/menos

~ Aproximadamente

= Igual a

≤ Menor que

≥ Mayor que

Å Armstrong

**A** Absorbancia

**ATCC** *American Type Culture Collection*

BHC Hexaclorociclohexano

**BV** baño de vapor

°C Grado centígrado

**CCF** Cromatografía en capa delgada

**CDA** Máximo consumo diario aceptable de plaguicidas para humanos

**CIP** *Collection de l'Institute Pasteur*

**CLAR** Cromatografía líquida de alta resolución

**cm** Centímetro

**DDT** Dicloro Difenil Tricloroetano

**Dm** Decímetro

**DMD** Dosis media tomada diariamente de la planta medicinal

**FAO** Organización para la Agricultura y la Alimentación

**G** Gramo

**g** Gravedades

**h** Hora

**IFO** *Institute for Fermentation, Osaka, Japan*

**IMI** *Commonwealth Mycological for Standardization*

**k** Factor de corrección

**kg** Kilogramo

**L** Litro

**L1** Soporte para CLAR (Ver *MGA 0241*) Octadecilsilano enlazado químicamente al sílice porosa o micropartículas de cerámica de 5 µm a 10 µm de diámetro

**M** Molaridad

µm Microgramo

µL Microlitro

µm Micrometro

**m/m** Masa en masa

**m/v** Masa en volumen

**mg** Miligramo

**MGA** Método General de Análisis

**MGA-FH** Método General de Análisis de la Farmacopea Herbolaria

**Min** Minuto

**mL** Mililitro

**MM** Masa molecular

**mm** Milímetro

**mM** Milimolar

**mN** Milinormal

**N** Normalidad

**N<sub>D</sub><sup>20</sup>** Índice de refracción

**NBRC** *National Board of Respiratory Core*

**NCIMB** *The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited*

**NCPF** *National Collection of Pathogenic Fungi*

**NCTC** *National Collection of Type Cultures*

**nm** Nanómetro

**NMP** Número más probable

**No.** Número

**NRA** Nivel residual aceptable (*ARL*, siglas en inglés)

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**ppm** Partes por millón

**R<sub>F</sub>** En cromatografía, designa la relación entre la distancia recorrida por una sustancia y la sustancia recorrida por la fase móvil utilizada

**rpm** revoluciones por minuto

**SA** Solución amortiguadora

**SI** Solución indicadora

**SR** Solución reactivo

**SRef** Sustancia de referencia

**SV** Solución volumétrica

**UFC** Unidades Formadoras de Colonias

**UV** Ultravioleta  
**v/m** Volumen en masa  
**v/v** Volumen en volumen  
**VIS** Visible  
**X** Aumentos  
**x** Por

## Anexo 6.- Volumen de ventas de aceites esenciales en México

<b>Instituto Nacional de Estadística y Geografía</b>				
<b>INEGI. Censos Económicos 2014. Resultados definitivos</b>				
Fecha de consulta: 01/08/2019 12:34:17 p. m.				
<b>Año Censal</b>	<b>Entidad</b>	<b>Actividad Económica</b>	<b>UE Unidades económicas</b>	<b>M030A V elaborac extraído</b>
2014	00 Total Nacional	325190 Fabricación de otros productos químicos básicos orgánicos	133	
2014	00 Total Nacional	325999 Fabricación de otros productos químicos	663	
2014	00 Total Nacional	434222 Comercio al por mayor de productos químicos para la industria farmacéutica y para otro uso industrial	2,668	
La suma de los parciales puede no coincidir con el total por efectos del redondeo.				
Los renglones en los que la clave de la actividad económica tenga una o varias letras "C" o "SC" presentan agrupados los datos de varios subsectores o sectores de actividad, debido al principio de confidencialidad.				

## Anexo 7.- Medicamentos herbolarios

Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional. <sup>(1)</sup>

Listado de medicamentos herbolarios:

Titular	Denominación distintiva	Denominación genérica	Forma farmacéutica
Salud Natural Mexicana S.A de C.V. <sup>(2)</sup>	MINAZZA	Menta x piperita	Linimento*
WYETH, S.A de C.V. <sup>(2)</sup>	ENTEROKAN	Menta piperita y Carum carvi	Cápsulas
NOVARTIS FARMACEUTICA, S.A de C.V. <sup>(2)</sup>	TESALITOS	Aceite de Eucalyptus globulus, mentol y alcanfor	Parches
DISTRIBUIDORA DE ALIMENTOS NATURALES Y NUTRICIONALES, S.A de C.V. <sup>(2)</sup>	BRONCORUB	Mentol, Eucalipto y Trementina	Ungüento
Schwabe México, S.A de C.V. <sup>(2)</sup>	LASEA	Lavandula angustifolia	Cápsulas
-----	Pastillas Juanola <sup>(3)</sup>	Cineol, extracto de regaliz, terpina, mentol	-----
-----	Vicks Vaporub <sup>(3)</sup>	Alcanfor, timol, trementina, mentol, aceite de eucalipto.	-----
-----	Alpina Tila <sup>(3)</sup>	Espino blanco, limón, menta, tila.	-----
-----	Sinus <sup>(3)</sup>	Alcanfor, cineol, menta, pino, mentol, eucalipto	-----
-----	Vicks inhalador <sup>(3)</sup>	Alcanfor, salicilato de metilo, aceite de saсаfrás, menta, acetato de bornilo	-----

-----	Pazbronquial <sup>(3)</sup>	Codeína, efedrina, sulfoguayacol, tiamina, mentol, tinturas vegetales.	-----
-------	-----------------------------	--	-------

\*Preparación menos espesa que el ungüento en la cual tiene como base aceites y bálsamos y se aplica exteriormente en fricciones.

<sup>(1)</sup>LEY GENERAL DE SALUD. (21 Junio 2018).

<sup>(2)</sup> COFEPRIS. (2001-2019). REGISTROS SANITARIOS DE MEDICAMENTOS HERBOLARIOS. *Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.*

<sup>(3)</sup> Granda, E., & Mateo, M. (Mayo 2005). Plantas medicinales. *ELSEVIER Farmacia Profesional*, 8-15.