

SCREENING POR CROMATOGRFÍA EN CAPA DELGADA DE SUSTANCIAS ESTIMULANTES COMO ADULTERANTES EN SUPLEMENTOS DIETARIOS.

Sinelli Julieta

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral.

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Bioquímica

Grupo: X

Palabras clave: suplementos dietarios, adulterantes, cromatografía en capa delgada.

INTRODUCCIÓN

Los preparados vegetales y sus derivados (suplementos dietarios naturales, medicamentos herbarios, etc.) son percibidos por la población, según Haneef y col., (2013), como productos con actividad terapéutica pero inofensivos para la salud. Entre los suplementos dietarios de venta libre los destinados al control de peso son ampliamente consumidos por personas con sobrepeso u obesidad. Según Tang y col., (2011) la popularidad y demanda de este tipo de productos está en aumento en todo el mundo. Aunque estas preparaciones formuladas con nutrientes, hierbas y fibras, no deben contener fármacos agregados, Calahan y col., (2016) han reportado numerosos casos de adulteraciones realizadas con el objetivo de aumentar el efecto terapéutico, satisfaciendo rápidamente a los consumidores, pero sin contemplar el riesgo para la salud que esto implica. Las drogas más comúnmente asociadas con la adulteración de este tipo de suplementos dietarios incluyen: anorexígenos, estimulantes, antidepresivos, diuréticos y laxantes. Muchas de éstas drogas se encuentran bajo estricto control de prescripción, mientras que otras han sido prohibidas por tener peligrosos efectos adversos en humanos, tal como describen Carvalho y col., (2011). En la revisión de Haneef y col., (2013) se presentan varios métodos de análisis publicados para la determinación de estimulantes basados en cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de intercambio iónico, con diferentes detectores. Estos métodos implican tiempo de análisis largos, pretratamientos complejos e instrumental costoso.

OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un método de screening rápido y reproducible, basado en cromatografía en capa delgada (CCD), para el análisis rutinario y simultáneo de varias sustancias estimulantes en matrices complejas como lo son los productos herbales y suplementos dietarios a base de hierbas.

METODOLOGIA

Suplementos dietarios

Como muestras reales se emplearon 5 suplementos dietarios de venta libre para la pérdida de peso cuyo nombre y contenido declarado se muestran en la **Tabla 1**. Estas muestras fueron adquiridas en dietéticas, farmacias y locales de suplementación deportiva de la ciudad de Santo Tomé.

Nombre	Composición declarada
--------	-----------------------

Proyecto: Desarrollo de estrategias protocolizadas para el control analítico de fármacos y nutracéuticos en muestras complejas

Director del proyecto: María Silvia Cámara; Co-director del proyecto: María Mercedes De Zan

Director del becario: María Mercedes De Zan; Co-director del becario: Yamile Soledad Caro

Adelgar (Excelencia Natural S.A.)	Fucus; Hisopo; Cola de caballo; Psyllium; Vit B5
Café verde compuesto (Lafarmen)	Café verde 400 mg; Algas marinas 100 mg; Garcinia cambogia 75 mg; Centella asiática 75 mg.
Reductase (Natufarma)	Garcinia cambogia ES(*) 250 mg; L-carnitina 20 mg
Thermogenix (Hoch Sports)	Ácido ascórbico 45 mg; Vitamina B6 2,6 mg; ES Guaraná 450 mg (20% cafeína); ES Café verde (ácido clorogenico) 400 mg; ES Citrus Aurantium (20% sinefrina) 400 mg; ES Te verde (20% cafeína) 350 mg; L-carnitina tartrato 300 mg; L-tirosina 300 mg.
Oxy-ELITE Pro (USPlabs)	119,5 mg; ES Bauhinia Purpurea (hoja y vaina); ES Bacopa Monnieri (Hoja); 1,3-Dimetilamina HCl; ES Cirsium Oligophyllum (planta); ES Yohimbe (corteza). 100 mg Cafeína

Tabla 1: Suplementos dietarios. *ES: *Extracto seco*.

Preparación de soluciones estándar y muestras

Para preparar las *soluciones estándar stock* se pesaron alrededor de 5,00 mg de las siguientes sustancias de referencia en tubos eppendorf: cafeína (C), teofilina (T), efedrina (E), pseudoefedrina (Ps), yohimbina (Y) y mazindol (M). Todas fueron disueltas en 1,00 mL de metanol, por lo que la concentración aproximada de cada *solución estándar stock* resultó de 5,00 mg/mL. La *solución estándar combinada* se preparó mezclando volúmenes adecuados de las soluciones stock para tener con cada componente en una concentración final aproximada de 0,50 mg/mL.

La preparación de las muestras consistió en obtener un pulverizado, del cual se pesaron alrededor de 200,0 mg en tubos eppendorf y se extrajeron con 1,00 mL de metanol agitando en vórtex y sonicando durante 5 minutos para solubilizar los activos. Finalmente se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes lípidos de este tratamiento se utilizaron como *soluciones muestras basales*. Además, para demostrar la capacidad del sistema de detectar adulteraciones, se prepararon *soluciones muestras fortificadas* adicionando 100 µL de cada solución estándar stock a 80,0 mg de muestra y extrayendo con metanol para obtener una concentración final de fortificación de 0,50 mg/mL.

Para estudiar los límites de detección (LOD) se realizaron cinco diluciones sucesivas al medio de la solución estándar combinada, obteniendo soluciones con: 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,0313 mg/mL y 0,0156 mg/mL de cada activo.

Condiciones cromatográficas

El análisis por CCD se realizó en placas de sílica gel 60 F254 (Merck, Alemania). Se aplicaron 5,0 µL cada solución estándar o muestra a 1,5 cm de la base y con 1,0 cm de separación entre cada una. La placa se desarrolló en una cámara previamente saturada con una mezcla de cloroformo: diclorometano: isopropanol: hidróxido de amonio al 28% en las siguientes proporciones 60:30:15:2,5.

Para revelar las placas se utilizaron tres sistemas: Luz UV a 254 nm, luz UV a 365 nm y solución de ninhidrina.

RESULTADOS

Selectividad del sistema cromatográfico

Debido a las diferentes estructuras que posee cada compuesto, no todos pudieron ser revelados con los mismos sistemas. El grupo de las xantinas (cafeína, teofilina y yohimbina) junto con el mazindol presentan buena señal con el sistema de luz UV a 254nm, mientras que la efedrina y la pseudoefedrina requieren revelado con de solución de ninhidrina (**Fig. 1C**). Como se observa en la **Fig. 1**, todos los componentes de la mezcla logran separarse correctamente con esta fase móvil, excepto cafeína y yohimbina que (**Fig. 1A**). Por este motivo, se buscaron formas de

revelado que permitan distinguir estos dos compuestos, sin la necesidad de recurrir a otro sistema de separación. Una de las posibilidades fue utilizar la solución de ninhidrina, que colorea selectivamente a la yohimbina respecto a la cafeína. Otra de las posibilidades, fue observar las placas con luz UV a 365 nm (**Fig. 1B**), longitud de onda a la cual la yohimbina absorbe la radiación, mientras que la cafeína no lo hace.

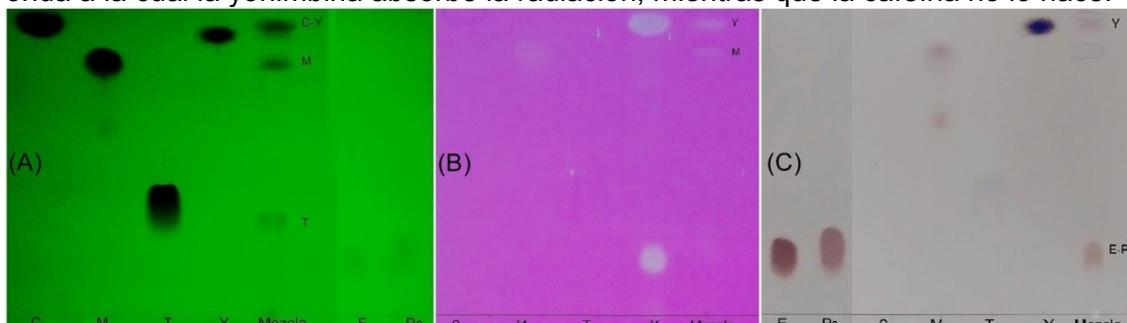


Figura 1: Placas reveladas con **(A)** luz UV 254 nm; **(B)** luz UV 365 nm; y, **(C)** solución de ninhidrina. Referencias: C: Cafeína; M: Mazindol; T: Teofilina; Y: Yohimbina; E: Efedrina; Ps: Pseudoefedrina; Mezcla: Solución estándar combinada.

Contenido de activos en las muestras estudiadas

En las muestras basales evaluadas, se pudo detectar la presencia de cafeína en las siguientes: Oxy-ELITE Pro y Thermogenix.

Estudio de recuperación y efecto matriz

Para corroborar que las matrices de las muestras, no interfieren (aumentando o disminuyendo la señal) en la detección de los adulterantes estudiados, se sembró en una placa las soluciones muestra fortificadas. Como se puede observar en la **Fig. 2**, no hay modificaciones en la intensidad de la señal en ninguna de las muestras demostrándose la capacidad del sistema en detectar las adulteraciones.

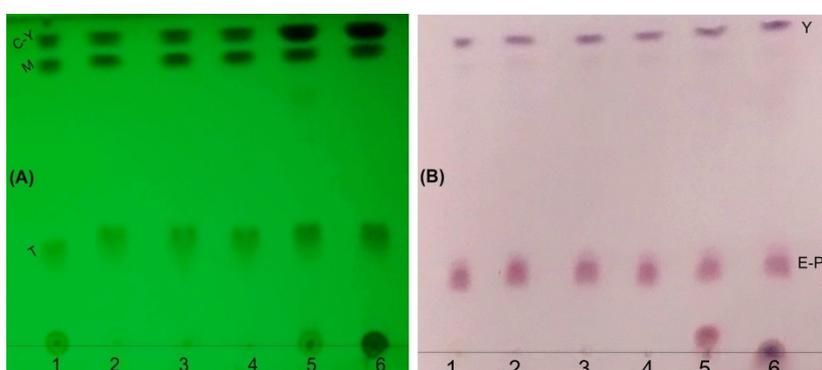


Figura 2: Muestras fortificadas. Placa revelada con **(A)** luz UV 254 nm; y, **(B)** ninhidrina. Referencias: 1: Adelgar; 2: Café verde compuesto; 3: Reductase; 4: Solución estándar combinada; 5: Oxy-ELITE Pro; 6: Thermogenix.

Límites de detección

En la **Fig. 3** se muestran las placas del estudio de LOD en cada sistema de revelado, mientras que en la **Tabla 2**, se presentan las concentraciones mínimas detectadas en cada caso. La yohimbina es la única sustancia que puede ser evidenciada por los tres sistemas de revelado, teniendo mayor sensibilidad con la luz UV a 254 nm.

Sustancia	Luz UV 254 nm	Luz UV 365 nm	Ninhidrina
Cafeína	0,031 mg/mL	-	-
Yohimbina	0,031 mg/mL	0,063 mg/mL	0,125 mg/mL
Teofilina	0,031 mg/mL	-	-
Efedrina	-	-	0,012 mg/mL
Pseudoefedrina	-	-	0,012 mg/mL

Mazindol	0,012 mg/mL	-	-
----------	-------------	---	---

Tabla 2: Límite de detección de cada sustancia según sistema de revelado.

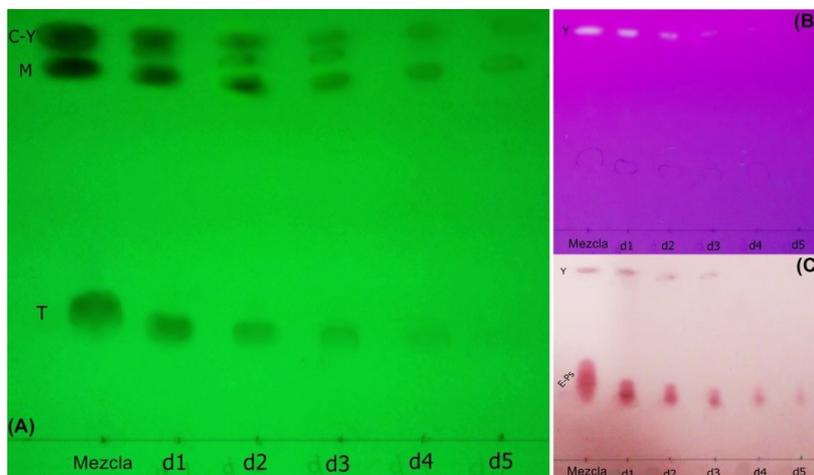


Figura 3: Límite de detección de estimulantes revelado con (A) luz UV 254 nm; (B) luz UV 365 nm; y, (C) ninhidrina. Referencias: Mezcla: solución estándar combinada (0,50 mg/mL); d1: dilución al $\frac{1}{2}$ de Mezcla. d2: dilución al $\frac{1}{2}$ de d1. d3: dilución al $\frac{1}{2}$ de d2. d4: dilución al $\frac{1}{2}$ de d3. d5: dilución al $\frac{1}{2}$ de d4.

CONCLUSIONES

Mediante este método se logró en pocos minutos, detectar la presencia de cafeína, teofilina, yohimbina, mazindol, efedrina y pseudoefedrina en todas las muestras fortificadas (adulteración en 0.1% p/p). El método propuesto es útil y accesible para los organismos de control y pequeños laboratorios debido a su simplicidad, bajos costo de aplicación y uso de instrumentos económicos, lo cual es muy importante para garantizar la seguridad de la población que consume suplementos dietarios destinados al control de peso.

BIBLIOGRAFÍA

- Calahan, J., Howard, D., Almalki, A., Gupta, M. P., & Calderón, A. I., 2016. Chemical adulterants in herbal medicinal products: A review. *Planta Med*, 82, 505-515.
- Cianchino, V., Acosta, G., Ortega, C., Martinez, L., & Gomez, M., 2008. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 1075-1081.
- de Carvalho, L. M., Martini, M., Moreira, A. P., de Lima, A. P., Correia, D., Falcao, T., y otros. 2011. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. *Forensic Science International*, 204, 6-12.
- Haneef, M., Shaharyar, A., Husain, M., Rashid, R., Mishra, N., Siddigueb, N. y col. 2013. Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditional herbal medicines as adulterants. *Drug Test. Analysis*, 5, 607-613.
- Tang, M., Chen, S., Chan, A., & Mak, T. 2011. Case series on a diversity of illicit weight-reducing agents: from the well known to the unexpected. *Br J Clin Pharmacol*, 71, 250-253.