

Drogas naturistas: Estudio de caso

Juan Diego Rojas Díaz

Trabajo de Grado para Optar por el título de Químico

Directora

Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Codirector

Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A mis progenitores y abuelos.

A mis profesores.

A ti, por el apoyo y dedicación.

Agradecimientos

A la profesora Elena y al profesor Jairo, por aceptarme como parte de esta familia tan grande que es el grupo de investigación, e instruirme.

A mis compañeros y amigos del Cenivam por la colaboración, guía y el apoyo brindado. Fueron un soporte indispensable en mi desarrollo personal.

A mis padres por su entera confianza y apoyo.

A ti, por ser esa flor que me impulso a lograrlo. Con todo mi cariño, Deisy.

A la Universidad Industrial de Santander, por permitir que me formara como profesional íntegro.

Tabla de Contenido

	Pag.
Introducción.....	18
1. Marco teórico	22
1.1. Calendula officinalis.....	22
1.2. Metabolitos secundarios	24
1.2.1. Terpenos.....	24
1.2.2. Alcaloides.....	25
1.2.3. Compuestos fenólicos	26
1.3. Producto fitoterapéutico.	26
1.4. Uso tradicional.....	27
1.5. Sustancias activas (<i>crude drugs</i>).	27
1.6. Producto fitoterapéutico alterado.	27
1.7. Técnicas de extracción	28
1.7.1. Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).	28
1.7.2. Extracción con solventes.....	28
1.8. Análisis instrumental.....	29
1.8.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	29
1.8.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia	31
1.8.3. Analizador <i>Orbitrap</i>	31
2. Cienciometría.....	32
3. Objetivo general.....	38
3.1. Objetivos específicos.....	38
4. Justificación	39
5. Desarrollo experimental	40

5.1. Materiales, reactivos, solventes y estándares	41
5.2. Recolección de las muestras	42
5.2.1. Obtención de la planta de caléndula	42
5.2.2. Consecución del fitofármaco	42
5.3. Determinación del peso promedio de las grageas del fitofármaco.....	43
5.4. Liofilización del material vegetal.....	43
5.5. Obtención de extractos	43
5.5.1. Extracción de metabolitos secundarios.	43
5.6. Preparación de la curva de calibración.....	45
5.7. Análisis instrumental.....	47
5.7.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	47
5.7.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con detector de masas <i>Orbitrap</i> e interfaz de electronebulización.	49
6. Resultados y discusión.	52
6.1. Análisis por GC-MS de los extractos de caléndula y del fitofármaco.	52
6.2. Análisis por LC- <i>Orbitrap</i> -MS del extracto de caléndula.....	62
6.3. Análisis por LC- <i>Orbitrap</i> -MS del extracto MSPD del fitofármaco.....	77
6.4. Análisis cuantitativo del diclofenaco por GC-MS-SIM y UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS	85
7. Conclusiones.	88
8. Recomendaciones.	89
Referencias	90

Lista de figuras

Figura 1. Dibujo típico de la planta <i>C. officinalis</i> . (Tomado de https://www.123rf.com/photo_61722830_stock-vector-vector-illustration-of-medicinal-plant-calendula-officinalis-pot-marigold-in-retro-style.html).....	23
Figura 2. Estructuras de algunos flavonoides presentes en <i>C. officinalis</i> : quercetina, isoramnetina y rutina.	23
Figura 3. Unidad de isopreno.....	24
Figura 4. Relación de publicaciones por año. Periodo de observación: 2000-2018. Palabras clave: Calendula & officinalis & composition. Base de datos: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta: 24 de octubre de 2018.	33
Figura 5. Relación del número de publicaciones por año. Periodo de observación: 2009-2018. Palabras clave: Calendula & officinalis & Medicine. Base de datos: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta: 24 de noviembre de 2018.	35
Figura 6. Relación del número de publicaciones por año. Periodo de observación: 1995-2018. Palabras clave: Adulterant & Natural & Medicine. Base de datos: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta: 1 de agosto de 2018.	36
Figura 7. Esquema general del trabajo realizado.	40
Figura 8. Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas AT MSD 5973 Network. Fuente: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 22 de diciembre de 2018.	49
Figura 9. Cromatógrafo líquido UHPLC Dionex Ultimate 3000, acoplado a espectrómetro de masas <i>Orbitrap</i> Exactive Plus, con interfaz de electronebulización. CENIVAM, Laboratorio Alexander Makarov. UIS. Bucaramanga, 22 de diciembre de 2018.	51

Figura 10. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS del extracto de flores de caléndula. Columna DB-5MS, 60 m. Splitless. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos en la Tabla 5.	54
Figura 11. Perfil cromatográfico GC-MS del extracto del fitofármaco obtenido en medio ácido. Columna DB-5MS, 60 m. Splitless. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los compuestos en la Tabla 6.....	56
Figura 12. Diclofenaco y compuestos derivados detectados en el extracto del fitofármaco: A. Diclofenaco; B. Amida del diclofenaco [1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona]; C. Alcohol-2-(2,6-diclorofenilamino)bencílico; D. 2-(2,6-Dicloroanilino)benzaldehído.....	58
Figura 13. Espectros de masas: A. Obtenido experimentalmente por GC-MS (pico número 6, Figura 11), identificado como diclofenaco y B. Espectro de masas de la base de datos NIST.	59
Figura 14. Ruta de fragmentación propuesta para el diclofenaco (MS, EI, 70 eV).....	60
Figura 15. Espectros de masas: A. Obtenido experimentalmente por GC-MS (pico número 5, Figura 11), identificado como amida del diclofenaco y B. Espectro de masas de la base de datos NIST.....	61
Figura 16. Corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a las moléculas protonadas MH^+ , identificadas en el extracto MSPD de caléndula. La escala absoluta de $4,5 \times 10^6$ fue ajustada (normalizada).....	64
Figura 17. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo <i>full scan</i> correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 757.21713) de la mangaslina ($C_{33}H_{40}O_{20}$), $t_R = 3.83$ min. LC-ESI ⁽⁺⁾ -Orbitrap-MS.....	65
Figura 18. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI ⁽⁺⁾ -Orbitrap-MS, de la mangaslina ($C_{33}H_{40}O_{20}$), $t_R = 3.83$ min, adquirido en modo <i>full scan</i>	66

- Figura 19. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 611.16173) de la rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$), $t_R = 4.02$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS 67
- Figura 20. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, de la rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$), $t_R = 3.98$ min, adquirido en modo *full scan*. 68
- Figura 21. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 771.23431) del tifaneósido ($C_{34}H_{42}O_{20}$), $t_R = 4.02$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS. 69
- Figura 22. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, del tifaneósido ($C_{34}H_{42}O_{20}$), $t_R = 4.02$ min, adquirido en modo *full scan*. 70
- Figura 23. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 625.17747) del calendoflavósido ($C_{28}H_{32}O_{16}$), $t_R = 4.16$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS..... 71
- Figura 24. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, del calendoflavósido ($C_{28}H_{32}O_{16}$), $t_R = 4.16$ min, adquirido en modo *full scan*. 72
- Figura 25. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 465.10268) de la isoquercetina ($C_{21}H_{20}O_{12}$), $t_R = 4.22$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS..... 73
- Figura 26. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, de la isoquercetina ($C_{21}H_{20}O_{12}$), $t_R = 4.22$ min, adquirido en modo *full scan*. 74
- Figura 27. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 625.17712) de la narcisina ($C_{28}H_{32}O_{16}$), $t_R = 4.33$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS. 75

- Figura 28. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-*Orbitrap*-MS, de la narcisina (C₂₈H₃₂O₁₆), t_R = 4.33 min, adquirido en modo *full scan*. 76
- Figura 29. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC), correspondientes a las moléculas protonadas [M+H]⁺ de los compuestos identificados en: A. El extracto MSPD de la caléndula (escala absoluta 4,5x10⁶) y B. El extracto MSPD del fitofármaco (1. Escala absoluta 8x10³ y 2. Escala absoluta de diclofenaco 3 x10⁶). 80
- Figura 30. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC), correspondientes a la molécula protonada MH⁺ (m/z 465.10268) de la isoquercetina (t_R = 4.22 min) (C₂₁H₂₀O₁₂). LC-ESI⁽⁺⁾-*Orbitrap*-MS. Modo de adquisición *full scan*. 81
- Figura 31. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a la molécula protonada MH⁺ (m/z 625.17747) del calendoflavósido (t_R = 4.16 min) (C₂₈H₃₂O₁₆) y la narcissina (t_R = 4.33 min) (C₂₈H₃₂O₁₆), LC-ESI⁽⁺⁾-*Orbitrap*-MS. Modo de adquisición *full scan*. 82
- Figura 32. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a la molécula protonada MH⁺ (m/z 771.23431) del tifaneósido (C₃₄H₄₂O₂₀), LC-ESI⁽⁺⁾-*Orbitrap*-MS. Modo de adquisición *full scan*. 83
- Figura 33. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a la molécula protonada MH⁺ (m/z 296,02396) del diclofenaco (t_R = 6.82 ± 0,03 min) (C₁₄H₁₁C₁₂NO₂). LC-ESI⁽⁺⁾-*Orbitrap*-MS. Modo de adquisición *full scan*. 84

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de los terpenos, según su el número de unidades de isopreno.....	25
Tabla 2. Materiales, reactivos, solventes y estándares.....	41
Tabla 3. Concentraciones y los volúmenes necesarios en la preparación de la curva de calibración, para el análisis de diclofenaco por GC-MS-SIM.	45
Tabla 4. Concentraciones y los volúmenes necesarios en la preparación de la curva de calibración, para el análisis de diclofenaco por LC- <i>Orbitrap</i> -MS.	46
Tabla 5. Metabolitos secundarios encontrados en el extracto etanólico de <i>C. officinalis</i>	53
Tabla 6. Compuestos identificados presentes en el extracto etanólico del fitofármaco bajo estudio.	57
Tabla 7. Metabolitos secundarios identificados presentes en el extracto MSPD de caléndula. ...	63
Tabla 8. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto MSPD del fitofármaco.....	79
Tabla 9. Curvas de calibración y niveles mínimos de cuantificación (NMC) del diclofenaco determinadas mediante GC-MS-SIM y UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS.	86
Tabla 10. Concentración del diclofenaco en pastillas del fitofármaco de diferentes lotes, determinada mediante GC-MS-SIM y UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS.....	87

Apéndices

Apéndices A: Registro fotográfico del fitofármaco.....

Apéndices B: Comparación de perfiles cromatográficos del extracto del fitofármaco obtenido con diferentes solventes y a diferente pH.

Apéndices C: Curvas de calibración de diclofenaco.....

Apéndices D: Informe de resultados Laboratorio de Rayos X UIS.....

Nota: Ver apéndices en la carpeta adjunta al CD.

Lista de abreviaturas

AGC	<i>Automatic Gain Control</i> (Control de ganancia automática).
AIF	<i>All Ion Fragmentation</i> (Fragmentación de todos los iones).
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos.
<i>C. officinalis</i>	<i>Calendula officinalis</i> .
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
df	Espesor de la fase estacionaria.
DI	Diámetro interno.
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones).
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto con electrones).
EIC	<i>Extract Ion Current</i> (Corriente iónica extraída).
f.e.	Fase estacionaria.
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama).
FT	<i>Fourier-Transform</i> (Transformada de Fourier).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases).
GIA	<i>Global Industry Analysts</i> (Analistas de la industria global).
HCD	<i>Higher-Energy Collisional Dissociation</i> (Disociación por colisiones de alta energía).
HESI	<i>Heated - Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización con calentamiento).
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.
IRL	Indice(s) de retención lineal(es).

Istd	<i>Internal standard</i> (Estándar interno).
kV	kilo Voltios.
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida o cromatógrafo líquido).
<i>m/z</i>	Relación masa/carga.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas o espectro de masas).
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de masas en tándem).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida).
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ppm	partes por millón.
SE	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solvente).
<i>t_R</i>	Tiempo de retención.
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia).
UV-vis	Ultra violeta-visible.
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana.

Resumen

Título: DROGAS NATURISTAS: ESTUDIO DE CASO*

Autor: Juan Diego Rojas Díaz**

Palabras clave: Fitofármacos, adulterantes, principio activo, *Caléndula officinalis*

Descripción:

El uso de plantas y sus derivados con fines medicinales se conoce desde la antigüedad, dentro de estas plantas se encuentra la *Calendula officinalis*, la cual posee propiedades antiinflamatorias. Hoy día es muy común encontrar en el mercado fármacos cuyo principio activo sea un derivado de las plantas y sin la regulación adecuada se pueden presentar casos de adulteración en ellos.

Las ocho muestras del fitofármaco se obtuvieron de distribuidores de venta en Bucaramanga, Santander, quedando con cuatro números de lote de fabricación distintos y el material vegetal de *Calendula officinalis* se adquirió en el mercado central de Bucaramanga, los extractos fueron obtenidos por extracción con solvente y MSPD. El análisis de la composición de los extractos se realizó por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador *Orbitrap*, empleando una interface de electronebulización (LC-ESI-*Orbitrap*-MS). Por GC-MS para el extracto de *C. officinalis* se detectaron compuestos reportados en la literatura para esta especie, mientras que en el extracto del fitofármaco se encontró diclofenaco y derivados de este como compuestos mayoritarios. Por LC-ESI-*Orbitrap*-MS, en el extracto del fitofármaco y de la caléndula, se detectó narcisina, tifaneósido y calendoflavósido. La cantidad de diclofenaco encontrada en el fitofármaco fue cercana al 10%.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko. Química Ph.D.

Abstract

Title: NATURAL DRUGS: CASE STUDY*

Author: Juan Diego Rojas Díaz **

Key words: Phytodrugs, adulterants, active ingredient, Calendula officinalis

Description:

The use of plants and their derivatives for medicinal purposes is known since antiquity, within these plants is *Calendula officinalis*, which has anti-inflammatory properties. Nowadays it is very common to find in the market drugs whose active principle is a derivative of the plants and without the proper regulation can occur cases of adulteration in them.

The eight phytopharmaceutical samples were obtained from distributors for sale in Bucaramanga, Santander, with four different manufacturing batch numbers and the plant material of *Calendula officinalis* was purchased in the central market of Bucaramanga, the extracts were obtained by extraction with solvent and MSPD. The analysis of the composition of the extracts was performed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry with Orbitrap analyzer, using an electrospray interface (LC-ESI-Orbitrap-MS). By GC-MS for the extract of *C. officinalis* were detected compounds reported in the literature for this species, while in the phytopharmaceutical extract diclofenac was found and derivatives of this as major compounds. By LC-ESI-Orbitrap-MS, in the phytopharmaceutical extract and the calendula, narcisine, tifaneoside and calendoflavoside were detected. The amount of diclofenac found in the phytodrug was close to 10%.¹

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko. Química Ph.D.

Introducción

El uso de las plantas aromáticas con propiedades medicinales tiene una larga tradición. Se han usado sus metabolitos secundarios, aceites esenciales y extractos, como ingredientes activos en formulaciones terapéuticas. Desde sus inicios, estas propiedades son empleadas por las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos para el diseño y fabricación de sus productos. Los aceites esenciales son productos obtenidos a partir de plantas aromáticas, por técnicas destilativas; los aceites cítricos se obtienen por procedimientos mecánicos (prensados en frío). Los aceites esenciales son ingredientes ampliamente utilizados en la elaboración de perfumes, aromaterapia, industria cosmética, fitoterapia, especias y nutrición [1]. La aromaterapia es el uso de fragancias y aromas con fines terapéuticos para mitigar o prevenir enfermedades o infecciones, por medio de su inhalación [2].

Los extractos son obtenidos por técnicas de extracción con solvente o con fluido supercrítico. Se usan en la elaboración de productos farmacéuticos, alimentarios y suplementarios de todo tipo. La fitoterapia como ciencia ha estudiado el uso de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico. La humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, con variaciones a lo largo del tiempo, según los avances del conocimiento científico sobre estos productos, usando también las nuevas herramientas terapéuticas (fármacos de origen sintético). La base de los medicamentos fitoterapéuticos son las plantas aromáticas y medicinales y los diferentes tipos de sustancias, que de ellas se obtienen y que se conocen como “*droga cruda*” [3].

Dentro de los beneficios que se les han encontrado a los productos fitoterapéuticos, se pueden resaltar sus propiedades antioxidantes, antifúngicas, antimicrobianas, antibacteriales o antiinflamatorias [1]. Esto, sumado al hecho de ser de origen natural, ha llamado la atención de los consumidores, aumentando así su demanda [4] y dándoles popularidad frente a algunos fármacos de origen sintético, principalmente, por los posibles efectos secundarios nocivos de los últimos para la salud humana [5].

Por primera vez la adulteración de los productos naturistas con sustancias sintéticas fue reportada en China [6] y, tres años más tarde, en Australia [7]. Un estudio de 2609 muestras de medicamentos tradicionales en China, realizado mediante cromatografía en capa fina (TLC), determinó adulteración en el 25 % de las muestras; se detectaron las siguientes sustancias: *e.g.* cafeína (213), acetaminofén (167), indometacina (152) [8]. Van der Stricht, *et al.* (1994) [9] reportaron, por primera vez, la presencia de diclofenaco y otros adulterantes en grageas de *Chuifong Toukuwan*, un medicamento naturista chino para tratar la artritis. El método de extracción sólido-líquido ha sido el más usado en la determinación de adulterantes sintéticos (*e.g.*, diclofenaco) en medicamentos naturales, junto con las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en *tándem* (LC-MS/MS) [10-14]. Sildenafil, indometacina, tadalafilo, testosterona, glibenclamida, ibuprofeno, diazepam y diclofenaco figuran entre los adulterantes más usados y más frecuentes en fitofármacos que han sido detectados comúnmente.

Cuando una persona tiene una enfermedad o dolencia, acude al médico en busca de una solución y, al recetar un medicamento, muy pocas veces se pone en duda si será o no efectivo o corresponde al principio activo indicado en la caja. Siguiendo este pensar, una persona de 65 años, con dolores crónicos, acudió al médico en busca de una solución, el galeno le recomendó un fármaco, el cual aseguraba ser efectivo y de origen natural, y que le estaba funcionando con muchos otros de sus pacientes. La persona, con toda la confianza, lo adquirió y con las primeras dosis sintió su dolor disminuir. Pero, así como este dolor disminuyó, un dolor en articulaciones notó que tenía mareo, vértigo y dolor en el pecho y en el estómago, síntomas que antes no presentaba y esto la alarmó. La paciente quiso saber, cuál era el contenido de este “fitofármaco”, puesto que no entendía el porqué de sus nuevos síntomas y entregó una muestra al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la UIS. Como parte de la indagación y para conocer, si el caso de esta persona era un caso aislado, se preguntó a varios integrantes del grupo de investigación sobre este fitofármaco, y con la sorpresa se descubrió que había otras dos personas con familiares que, usando este fitofármaco, también presentaban síntomas adversos a su uso (dolor en el estómago, mareo, dolor en el pecho).

Todo esto motivó hacer el estudio más detallado para investigar la composición del fitofármaco. Para esto, se analizaron cuatro lotes distintos del mismo fitofármaco adquiridos en varias farmacias locales y una muestra de material vegetal de *Calendula officinalis*. Se empleó dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y extracción sólido-líquido como métodos de extracción y se usó cromatografía de gases y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, como técnicas de caracterización y cuantificación.

Como resultado de estos análisis se identificaron isoquercetina, narcisina y calendoflavosido, compuestos presentes en *Calendula officinalis*, pero también en el fitofármaco, se encontraron el diclofenaco y sus derivados en el fitofármaco, en concentraciones cercanas al 10% p/p, dosis que supera con creces lo recomendado para el uso peroral del diclofenaco. La muestra también se entregó al Laboratorio de Rayos X de la UIS, y después de varios meses de espera, llegó el resultado que indicaba que el fitofármaco contenía estrona, β -celulosa, codeína fosfato hidrato, tetracaina hidrocloreuro, procaína hidrocloreuro, diclofenaco sódico, acetato de cortisona; estas identificaciones se llevaron a cabo por comparación con fases cristalinas. Sin embargo, en el estudio realizado en este trabajo, solo se detectaron en el fitofármaco el diclofenaco y sus derivados, en concentraciones altas. Este ingrediente no fue declarado en la formulación presentada en la etiqueta de la caja, y, encontrándose en concentración alta, supera la dosis peroral permitida (se prescriben 2-3 grageas diarias) y, por sus efectos secundarios, puede, eventualmente, presentar un peligro para la salud del consumidor.

1. Marco teórico

1.1. *Calendula officinalis*

La *Calendula officinalis* (*C. officinalis*) (**Figura 1**) es una planta de la familia Asteraceae, género *Calendula*, que contienen alrededor de más de 20 especies. Es originaria del Este y Centro de Europa, crece en el Sureste asiático, Mediterráneo y Macronesia. Es una hierba anual, muy ramificada y aromática, con una altura entre 0,3 y 0,6 m, posee tallo angular sólido y con vellos, hojas sésiles de color verde claro, con una base semi-amplexicaule y forma ondulada, remotamente denticulada; hojas inferiores de entre 10 - 20 cm de largo y de 1 - 4 cm de ancho con forma espatulada; hojas superiores con 4 - 7 cm de largo de forma oblongada y flores compuestas de entre 5 a 7 cm, ubicadas en la punta de los tallos de color amarillo brillante o naranja, formadas por sépalos estrecholanceolados, cubiertos con pelos glandulares en ambos lados [15, 16].



Figura 1. Dibujo típico de la planta *C. officinalis*. (Tomado de https://www.123rf.com/photo_61722830_stock-vector-vector-illustration-of-medicinal-plant-calendula-officinalis-pot-marigold-in-retro-style.html).

Estudios de esta planta han identificado en sus extractos flavonoides (**Figura 2**) (quercetina, rutina, isoramnetina, calendoflavósido; cumarinas, quinonas, carotenoides), terpenoides [17], saponinas y sesquiterpenos (cariofileno) [15, 16]. La actividad biológica de estos compuestos hace de esta planta una opción para el tratamiento de la diaforesis, como estimulante, antiespasmódico y como principio activo de la medicina tradicional y convencional, en el tratamiento de problemas inflamatorios [18].

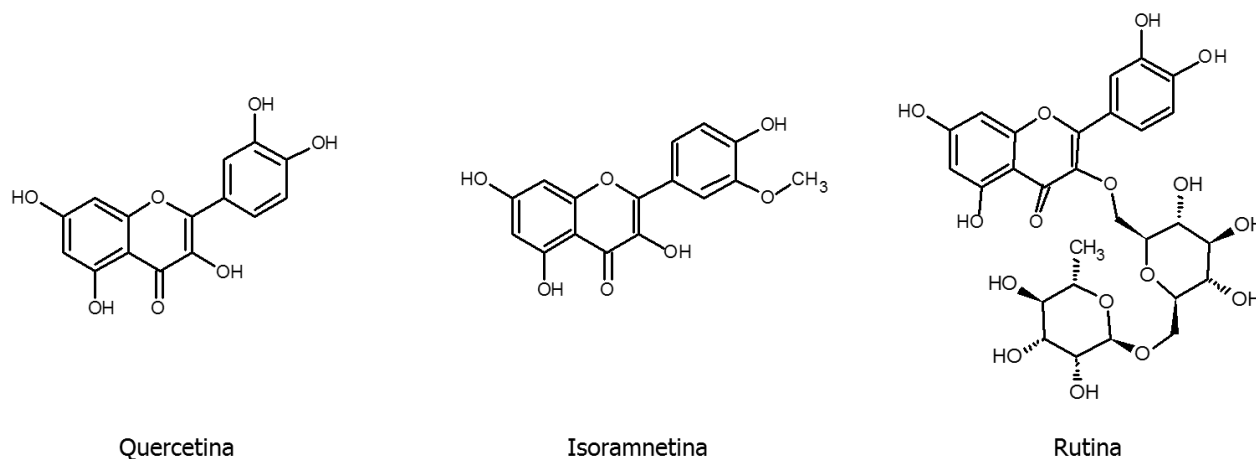


Figura 2. Estructuras de algunos flavonoides presentes en *C. officinalis*: quercetina, isoramnetina y rutina.

Dentro de los compuestos que más influencia tienen en su actividad anti-inflamatoria, figuran ésteres de los triterpenos: faradiol y maniladiol [19], así como glucósidos de los flavonoles de quercetina, isorhamnetina y rhamnetina [20].

1.2. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son moléculas de relativamente bajo peso molecular, las cuales no cumplen función aparente en los procesos básicos de crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo, pero sí ejercen funciones específicas como defensa, adaptación o comunicación de la planta con insectos, entre otras. Estos compuestos poseen diversas propiedades biológicas y son importantes en campos como la medicina, agricultura, cosmética y en la industria en general, debido a las diversas propiedades y usos que se les dan. Los metabolitos secundarios extraídos de las plantas se pueden dividir en tres grupos grandes: (1) terpenoides, (2) alcaloides y (3) compuestos fenólicos; en el último grupo, entran los glicósidos, taninos y saponinas, con diferentes estructuras específicas [21].

1.2.1. Terpenos. Son compuestos formados por unidades de isopreno, C₅ (Figura 3), unidas en la mayoría de los casos, de forma “cabeza-cola”. Esta familia de compuestos cuenta con más de 23.000 estructuras conocidas y, a ella, le pertenecen compuestos con actividad biológica importante, que se usan ampliamente en la industria y en medicina [21].

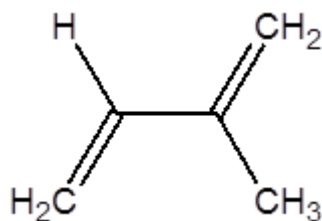


Figura 3. Unidad de isopreno.

Los terpenos se clasifican, según el número de carbonos o el número de unidades de isopreno presentes en su estructura, y se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. *Clasificación de los terpenos, según su el número de unidades de isopreno.*

Número de unidades de isopreno, C ₅	Nombre	Ejemplo
1	Hemiterpenos	Isopreno, ácido valérico
2	Monoterpenos	Linalool, mirceno, pineno
3	Sesquiterpenos	Humuleno, bisaboleno, cariofileno
4	Diterpenos	Ácido carnósico, fitol, retinol
5	Sesterterpenos	Retigeranina, hirtiosal
6	Triterpenos	Faradiol, taraxasterol
8	Tetraterpenos	Capsantina, rodoxantina
>8	Politerpenos	Caucho, gutapercha

Dentro de los estudios más destacados sobre estos compuestos, se encontró que los terpenos tienen propiedades bactericidas y antifúngicas, son repelentes de insectos, antioxidantes y agentes de comunicación entre especies, entre otras propiedades [21].

1.2.2. Alcaloides. Son compuestos que poseen uno o más átomos de nitrógeno en su estructura; también, pueden poseer oxígeno, azufre y, rara vez, cloro, bromo o fósforo. Este grupo de metabolitos secundarios se puede encontrar en algunos animales e insectos, pero es más común

hallarlos en las plantas. Los alcaloides poseen diversas actividades biológicas y por esto se usan ampliamente en la farmacología [21].

1.2.3. Compuestos fenólicos. Son compuestos orgánicos cuya estructura está formada por al menos un grupo fenol o un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Dentro de los estudios realizados sobre compuestos de esta familia se descubrió que muchos de ellos son anti-oxidantes, anti-inflamatorios, anti-cancerígenos, bactericidas, entre otras muchas propiedades. Estos compuestos se clasifican, según su número de grupos hidroxilo por anillo aromático, el número de fenoles unidos entre sí (mono-, di-, oligo- y poli-) y, según los grupos sustituyentes presentes en la molécula.

Los flavonoides pertenecen a la primera clasificación de los compuestos fenólicos y entran en la categoría de polifenoles. Se encuentran distribuidos por toda la planta dentro de las vacuolas y se dividen en antocianinas, flavonoles y flavonas. Dentro de la planta tienen múltiples funciones que incluyen la señalización química, la filtración de la radiación UV y la regulación de procesos fisiológicos [21].

1.3. Producto fitoterapéutico.

Es el producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de material de la planta medicinal o extractos obtenidos de esta, pueden encontrarse en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos. También, puede provenir de extractos, tinturas o aceites. No podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos. Los productos obtenidos de material de la planta medicinal, que haya sido procesado y obtenido en forma pura, no serán clasificados como producto fitoterapéutico [22].

1.4. Uso tradicional.

Se refiere a las pruebas documentales que demuestran que las sustancias activas presentes en las plantas medicinales se han utilizado durante tres o más generaciones con fines medicinales o en relación con la salud. En los casos en que el uso sea registrado como tradición oral y no escrita, las pruebas se obtendrán recurriendo a un profesional competente o a grupos indígenas o comunidades afrocolombianas que mantengan dicha historia [22].

1.5. Sustancias activas (*crude drugs*).

Son los ingredientes de los productos fitoterapéuticos que tienen actividad terapéutica. En el caso de los productos fitoterapéuticos, cuyas sustancias activas hayan sido identificadas, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados que las cuantifiquen. En los casos en que no se puedan identificar las sustancias activas, se puede considerar que todo el material de la planta medicinal o su preparación constituyen la sustancia activa [22].

1.6. Producto fitoterapéutico alterado.

Se entiende por producto fitoterapéutico alterado, cuando le son sustituidos, sustraídos totalmente o parcialmente o reemplazados los elementos constitutivos que forman parte de la composición oficialmente aprobada o cuando se le hubieren adicionado sustancias que puedan modificar sus efectos o sus características farmacológicas, fisicoquímicas u organolépticas [22]. Dentro de los adulterantes más usados se encuentran compuestos de la familia de los anti-inflamatorios no

esteroideos (AINEs), corticoides, anorexígenos, diuréticos y laxantes, anti-diabéticos orales y medicamentos para la disfunción eréctil [23-25].

1.7. Técnicas de extracción

1.7.1. Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) es una técnica de extracción introducida por Baker, S. en 1989 [26]. Permite el aislamiento de analitos presentes en una matriz sólida, semisólida o viscosa mediante la disminución del tamaño de partícula de la matriz ocasionada por la fuerza mecánica aplicada en un mortero y el uso de materiales abrasivos como agentes dispersantes. La técnica posee un alto porcentaje de extracción, gracias al uso de adsorbentes, dispersantes y solventes de elución afines a los analitos de interés, y tiene la ventaja de no requerir una cantidad alta de material vegetal [26,27].

Uno de los adsorbentes más usados es la sílice funcionalizada con C₁₈. Durante la MSPD, se llevan a cabo, en una misma tarea, la dispersión, extracción y limpieza de la muestra. Como agentes dispersantes y eluyentes se usan solventes volátiles altamente afines a los analitos como alcoholes [26]. Este método ha sido ampliamente usado para el análisis de fármacos, contaminantes, pesticidas y compuestos antioxidantes [28].

1.7.2. Extracción con solventes. La extracción con solventes orgánicos (SE, por sus siglas en inglés) es un tipo de extracción sólido-líquido en el que el material a utilizar se sumerge en un solvente con el fin de solubilizar la mayor cantidad posible de analitos objetivo. De esta manera, se pueden aislar grupos de compuestos, según la polaridad del o de los solventes usados [29]. La eficacia de este método de extracción aumenta, cuando se combina con el uso de ondas ultrasónicas, que tienen frecuencias mayores que los 20 kHz y que, al entrar en contacto con un

líquido, producen cavitación; este efecto hidrodinámico genera burbujas o cavidades de vapor dentro del líquido debido a cambios rápidos de presión. Estas burbujas, al entrar en contacto con un sólido, colapsan produciendo unos chorros de agua diminutos, los cuales chocan a gran velocidad con el sólido y le pueden proporcionar fracturas. En el caso de ser material vegetal, el sólido con el que se encuentren las burbujas, el golpe puede romper las paredes celulares y demás tejidos, permitiendo así una mejor extracción de los analitos [30].

1.8. Análisis instrumental

1.8.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La cromatografía es una técnica de separación, mencionada por primera vez en 1850 por el científico Alemán F.F. Runge, quien observó franjas de colores sobre el papel de filtro cuando, sobre este se ponían gotas de un colorante [31]; años más tarde, fue desarrollada a fondo por el científico ruso Mijaíl Tswett, quien logró separar dos tipos de pigmentos presentes en las hojas de una planta [32]. En 1952, A.T. James y A.J.P. Martin reportaron la separación de ácidos grasos volátiles, empleando la partición por cromatografía, usando nitrógeno como gas de arrastre y una mezcla de aceite de silicona/ácido esteárico soportado en tierras diatomáceas como fase sólida [33]. De esta fecha en adelante, la cromatografía de gases se ha venido desarrollando a un ritmo vertiginoso, pasando de equipos análogos, a equipos digitales, sistemas de procesamiento y almacenamiento de datos más complejos, de columnas empacadas hechas con cubiertas metálicas, de vidrio o de cuarzo, a columna tubulares abiertas fabricadas de sílice fundida o columnas capilares con la capacidad de llegar hasta los 100 m de longitud, lo cual permitió el mejoramiento de separación de los compuestos en mezclas complejas [33].

Otro factor importante que fue evolucionando junto con el desarrollo de la cromatografía, era la forma en la que se detectan e identifican los compuestos que emergen de la columna cromatográfica. Inicialmente, se usaron detectores con la capacidad de medir alguna propiedad física específica de estos compuestos, como la densidad, la impedancia o inclusive el peso, pero fueron sustituidos por detectores que aprovechaban otras particularidades de los compuestos orgánicos como la emisión de electrones o la capacidad de capturarlos. Dentro de estos detectores de ionización, los más destacados son los de la ionización en llama (FID, por sus siglas en inglés) y los detectores de captura de electrones (ECD, por sus siglas en inglés).

En el año 1959, Golhk describió por primera vez la introducción del flujo proveniente de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas y, en 1964, se publicó el primer análisis de productos naturales usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) [34]. Esta configuración presentaba problemas serios en cuanto a los flujos tanto de ingreso al espectrómetro de masas (MS, por sus siglas en inglés), como de salida del GC, por tanto, su auge se vio frenado hasta finales de los años 80, cuando aparecieron las columnas capilares, que demandan flujos más bajos, al punto de permitirle a las bombas de vacío de los MS funcionar correctamente [33].

El desarrollo de los cromatógrafos de gases se ha encaminado al mejoramiento de la eficiencia de separación (resolución), mientras que el desarrollo de los detectores se ha centrado en el aumento de la sensibilidad y la exactitud.

Comparado con la cantidad de compuestos existentes en el mundo, son apenas 10% de ellos, los que se pueden analizar mediante GC; estas sustancias deben cumplir ciertas características, por ejemplo, ser volátiles o volatilizables, termoestables (no descomponerse a temperaturas hasta los 350 °C) y tener bajo peso molecular (hasta *ca.* 250-300 Da). Pese a estas limitaciones, existen métodos para

hacer más estables compuestos, con grupos funcionales inestables a temperaturas altas. Un ejemplo es la técnica de derivación, en la cual se sustituye un grupo del analito, por otro que estabilice la molécula y aumente tanto su termoestabilidad como volatilidad y características cromatográficas.

1.8.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), es una técnica que se usa para separar los compuestos polares y poco volátiles, presentes en mezclas complejas, usando como fase móvil solventes presurizados y como fase estacionaria en un material absorbente una columna empacada. Los compuestos a separar pueden ser más pesados (>500 Da), no ser volátiles y ser termolábiles. Esta técnica se usa ampliamente para separar compuestos como aminoácidos, lípidos, proteínas, azúcares y metabolitos primarios y secundarios de plantas [35].

1.8.3. Analizador *Orbitrap*. El primer modelo de captura orbital fue implementado por Kingdon en 1923; este consistía en un cable estirado que pasaba a través del eje de un cilindro exterior, con sellos en los extremos y cuando se aplicaba una diferencia de potencial entre el cable y el cilindro, los campos generados atraían los iones hacia el cable y solo sobrevivían aquellos con suficiente velocidad tangencial, que no se chocaban con él. Alexander Makarov y colaboradores desarrollaron el analizador *Orbitrap*, que es un detector de corrientes iónicas [36].

En la actualidad, se usa el modelo propuesto inicialmente por Kingdon y desarrollado por Makarov, como un espectrómetro de masas con detección de corriente de imagen, con aplicación de la transformada de Fourier (FT, por sus siglas en inglés), para la “resolución” de dichas corrientes. Este detector puede estar acompañado de una celda de colisiones activadas y un

cuadrupolo que funciona como trampa. Gracias a esta configuración, el equipo alcanza un rango dinámico lineal de 0.5 a 500 ppm, resolución cercana a un millón, medición de masa/carga (m/z) hasta de 6000 y precisión de masas entre 1 y 5 ppm [37]. Gracias a estas características, este detector de masas se usa en la proteómica y metabolómica y es una herramienta valiosa en el estudio de productos naturales.

2. Cienciometría

Las **Figuras 4, 5 y 6**, muestran los resultados obtenidos durante la búsqueda bibliográfica realizada en la base de datos *Scopus (Elsevier)*. La **Figura 4** corresponde a la búsqueda de sobre composición del principio activo del fitofármaco estudiado que es extracto de caléndula; la **Figura 5** reporta el número de publicaciones relacionadas con la actividad biológica del principio activo del fitofármaco y, por último, la **Figura 6** muestra la cantidad de estudios publicados sobre la adulteración de fitofármacos en la medicina tradicional.

La primera búsqueda realizada fue sobre la planta de la cual se obtienen principios activos para la elaboración del fitofármaco y su composición química. La búsqueda cubre el periodo comprendido entre 2000 y 2018 (**Figura 4**).

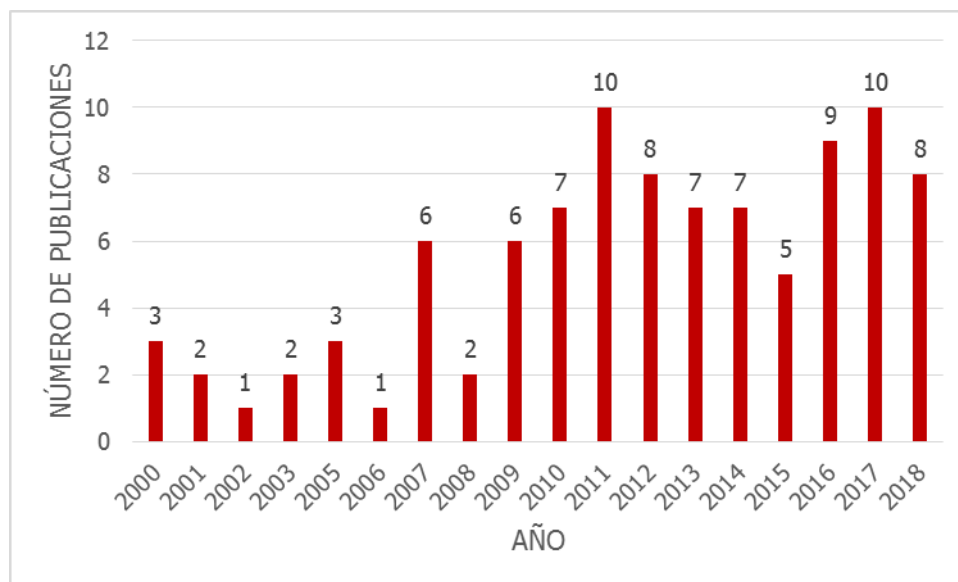


Figura 4. Relación de publicaciones por año. Periodo de observación: 2000-2018. Palabras clave: Calendula & officinalis & composition. Base de datos: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta: 24 de octubre de 2018.

Con estos parámetros de búsqueda, se encontraron de 97 artículos publicados, durante los años 2011 - 2017, se publicaron más artículos sobre el tema. Los principales campos de publicación fueron ciencias biológicas y agricultura, seguidos de farmacología, toxicología y farmacéutica, química e ingeniería química. Dentro de los trabajos a destacar durante este periodo se encuentra el realizado por Bakó, E. *et al.* (2002) [38], quienes emplearon extracción con solvente y HPLC con detector UV-Vis para extraer y caracterizar carotenoides presentes en material vegetal fresco, seco (té) y tinturas de *Calendula officinalis*. Los investigadores encontraron que las flores de *C. officinalis* contenían principalmente flavoxantina, luteoxantina, auroxantina, licopeno y β -caroteno. Hamburguer, M. *et al.* (2003) [19], describieron un método para aislar ésteres de triterpenos (faradiol, maniladiol, taraxasterol y amyirin) de flores secas de *C. officinalis*, con el que lograron obtener fracciones con el 96% de pureza y concluyeron que con la metodología usada se puede extraer estos compuestos de otras plantas. Mullaicharam, A. *et al.* (2014) [17], realizaron una revisión sobre los compuestos

obtenidos mediante la extracción con diferentes solventes y los relacionaron con la actividad antiinflamatoria del extracto. Los autores dividieron los compuestos, según su familia, a saber: terpenoides (sitosteroles, estigmasteroles, faradiol, ursadiol, entre otros); flavonoides (quercetina, isorhamnetina, narcisina, entre otros); saponinas (calendoglucósidos); cumarinas (escopoletina, umbeliferona y esculentina); quinonas (carotenoides, violaxantinas, entre otros), y llegaron a la conclusión que la fracción soluble en acetato de etilo presentaba la mayor actividad anti-inflamatoria, gracias a la presencia de glicósidos del triterpeno oleanano. Con esta búsqueda, se obtuvo la información sobre la composición de *Calendula officinalis*, y de cuáles son los compuestos proporcionan el efecto antiinflamatorio.

El segundo parámetro de búsqueda fue sobre la actividad biológica que presenta *C. officinalis* y sus extractos como ingredientes farmacéuticos. Para esto, se usó la ecuación de búsqueda “*Calendula & officinalis & medicine*”, buscando publicaciones en el periodo de 2009-2018. Los resultados se muestran en la **Figura 5**.

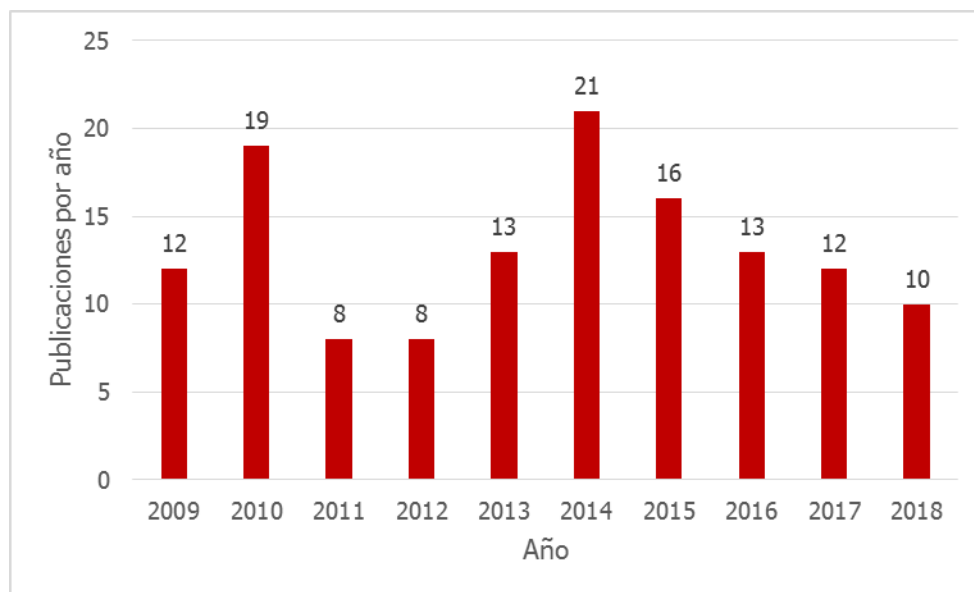


Figura 5. Relación del número de publicaciones por año. Periodo de observación: 2009-2018.

Palabras clave: *Calendula & officinalis* & Medicine. Base de datos: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta: 24 de noviembre de 2018.

Se encontraron 132 artículos publicados, usando esta ecuación de búsqueda; las áreas en las que se publicaron más artículos fueron farmacología, toxicología y farmacéutica, seguidas de medicina, bioquímica, ciencias biológicas y de la agricultura y química, entre otras.

De esta búsqueda, es importante resaltar los reportes de actividad biológica realizados por Lone, P. A. *et al.* (2015) [39], quienes evaluaron y constataron el uso de *C. officinalis* como un recurso etnobotánico y su aplicación farmacéutica en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, dermatológicas, bucales, artríticas y gastrointestinales. Martins, F. S. *et al.* (2014) [40], evaluaron los parámetros de extracción de la rutina, usando dos métodos muy comunes (extracción asistida por ultrasonido y maceración dinámica) y encontraron que los rendimientos más altos se obtuvieron usando una relación de 35-40% etanol:agua, 0.05-0.056%

material:solvente y 19-22 min de extracción. Mishra, A. K. *et al.* (2018) [41] estudiaron la toxicidad del aceite esencial obtenido de la planta, y determinaron que no es tóxico. Por otro lado, Nicolaus, C. *et al.* (2017) [42] midieron la actividad *in vitro* de extractos de caléndula como inhibidores de la inflamación y llegaron a la conclusión, que los extractos disminuían la inflamación; sin embargo, señalaron que se requerían más estudios para averiguar, cuál de los componentes actuaba como antiinflamatoria. Salehi, B. *et al.* (2018) [43], estudiaron el efecto del extracto de la caléndula obtenido con diclorometano:metanol (1:1) sobre células infectadas con VIH (*in vitro*) mediante el ensayo de tetrazoilo y reportaron que el extracto fue capaz de inhibir en un 85% la retro-transcripción. De la información obtenida se confirmó la actividad antiinflamatorio de los diferentes extractos de caléndula y la eficiencia de diferentes metodologías de extracción para su obtención.

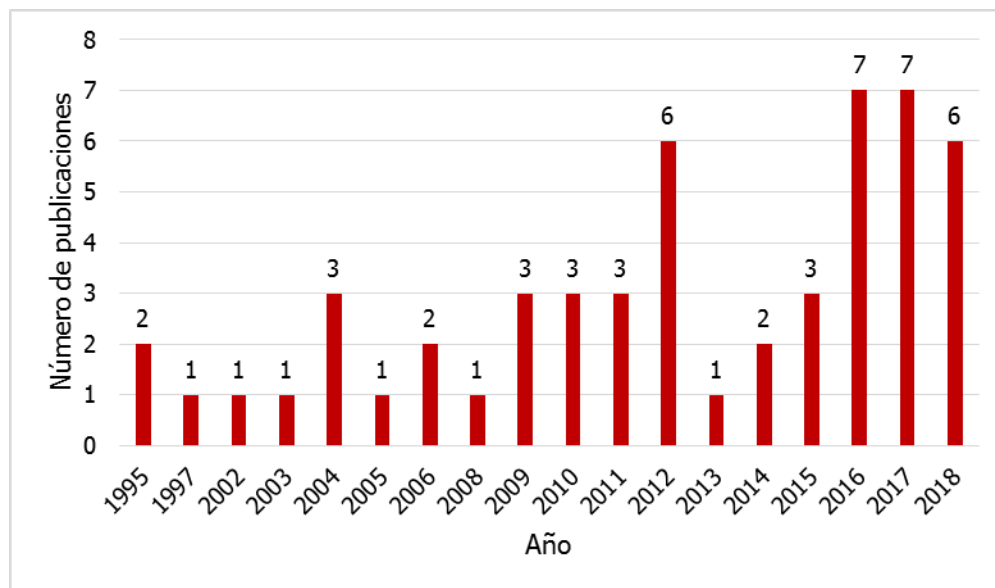


Figura 6. Relación del número de publicaciones por año. Periodo de observación: 1995-2018.

Palabras clave: Adulterant & Natural & Medicine. Base de datos: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta: 1 de agosto de 2018.

El tercer parámetro de búsqueda se basó en la información bibliográfica sobre los posibles compuestos no declarados en la formulación, en la etiqueta, que se pueden encontrar en los fitofármacos, motivados por la idea de una posible adulteración en la manufactura del fitofármaco estudiado. Para este fin, se usó la ecuación de búsqueda “*Adulterant & Natural & Medicine*”, con un período de búsqueda de 1995-2018; los resultados se muestran en la **Figura 6**.

En este periodo de tiempo, usando la ecuación de búsqueda mencionada, se encontraron 53 publicaciones, principalmente, en las áreas de farmacología, toxicología y farmacéutica, bioquímica, genética y biología molecular y química, entre otras. De los trabajos a destacar, se encuentra uno, realizado por Ku, Y. *et al.* (1995) [44] quienes usaron cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD, por sus siglas en inglés) para analizar 17 adulterantes sintéticos en productos naturales, y encontraron acetaminofén, diazepam y cafeína como principales adulterantes. En otro estudio, Savaliya, A. *et al.* (2010) [24] estudiaron 85 productos con base en las plantas, comercializados en la India, y encontraron sildenafil (viagra) como adulterante; en este estudio, se realizó una extracción con metanol, asistida por ultrasonido. En productos “naturales” para bajar de peso, Moreira, A. P. L. *et al.* (2013) [25], buscando adulterantes, encontraron hidroclorotiazida (diurético), no declarada en la etiqueta, en tres de las 26 muestras analizadas. Ching, C. *et al.* (2018) [45] estudiaron 404 casos del Laboratorio de Referencia de Toxicología de la Autoridad Hospitalaria en China, los cuales involucraron el uso de 487 productos de Medicina china patentada y encontraron 1234 adulterantes. Los principales compuestos fueron la sibutramina (supresor del apetito), presente en el 32% de las muestras, la fenolftaleína (18%) y el diclofenaco (antiinflamatorio no esterooidal) (12%). En cuanto al uso de los productos analizados, el

37% de estos medicamentos adulterados se indicaban para la reducción de peso y el 23%, para el tratamiento del dolor.

La revisión bibliográfica realizada permitió identificar los compuestos presentes en la planta que son de interés para el estudio y dio una idea sobre el método de extracción a emplear, también dejó en evidencia el hecho de que la inclusión de fármacos sintéticos en los fitofármacos, requiere mucha atención en cuanto a la protección de la salud del consumidor.

3. Objetivo general

El objetivo general de este estudio fue determinar adulterantes en un producto naturista a base de *C. officinalis* disponible comercialmente en Bucaramanga, empleando técnicas instrumentales GC-MS y LC-MS.

3.1. Objetivos específicos

Los objetivos específicos del trabajo se centraron en: (1) establecer una condición de extracción sólido-líquido y MSPD para el análisis de los componentes reportados en un fitofármaco comercial; (2) determinar las mejores condiciones operacionales de análisis de adulterantes en medicamentos naturistas mediante GC-MS y UHPLC-*Orbitrap*-MS; (3) determinar los flavonoides presentes en el producto naturista a base de *Calendula officinalis* y compararlos con los presentes en la planta de

caléndula y (4) cuantificar adulterantes en el producto naturista a base de *C. officinalis*, usando extracción sólido-líquido, MSPD y diferentes técnicas instrumentales (GC-MS y LC-MS).

4. Justificación

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 % de las personas que viven en países en vía de desarrollo dependen de fuentes herbales para tratar los problemas de salud [46].

Estos medicamentos de uso tradicional se distribuyen como medicinas recetadas o de venta libre y, se estima que el 25 % de los productos farmacéuticos se derivan directa o indirectamente de las plantas superiores [47], considerándolos seguros e inofensivos. La *Global Industry Analysts* (GIA), predice que para el año 2020, se espera un incremento en el mercado global de suplementos y medicamentos herbarios, y este alcanzaría los 115 mil millones de dólares, debido al aumento de conciencia de la importancia de principios activos naturales por parte de los consumidores [48]. La OMS, afirmó que para el año 2050, el requerimiento de productos a base de plantas será de cinco millones de millones de dólares [4].

El mercado de suplementos y medicamentos herbarios está en constante aumento, lo cual genera una demanda cada vez más alta de material vegetal. Sin embargo, en varios países existe suficiente evidencia de la presencia de sustancias no declaradas en la etiqueta de productos naturistas. Por ejemplo Ku, Y.*et al.* (1995) [44] analizaron distintos medicamentos herbarios producidos en China en búsqueda de adulterantes sintéticos; Huang, W. *et al.* [8], analizaron 2609 muestras colectadas durante un año, de las cuales 618 estaban adulteradas, con las sustancias de origen sintético, *e.g.*, acetaminofén, ácido acetil salicílico, entre otros.

En Colombia, existe un mercado de casi nueve billones de pesos de la industria farmacéutica [49]; nuevos productos declarados naturistas ingresan al mercado, bajo la premisa de aliviar dolencias con formulaciones basadas en ingredientes naturales. Sin embargo, en el país no se ha realizado ningún tipo de análisis riguroso de los posibles compuestos no naturales, de origen sintético, incorporados en los productos naturistas, que, eventualmente, en vez de aliviar y mejorar, pueden empeorar el estado de salud de las personas, quienes consumen estos farmacos.

5. Desarrollo experimental

La **Figura 7** muestra el esquema general de la metodología empleada para el desarrollo de la investigación.

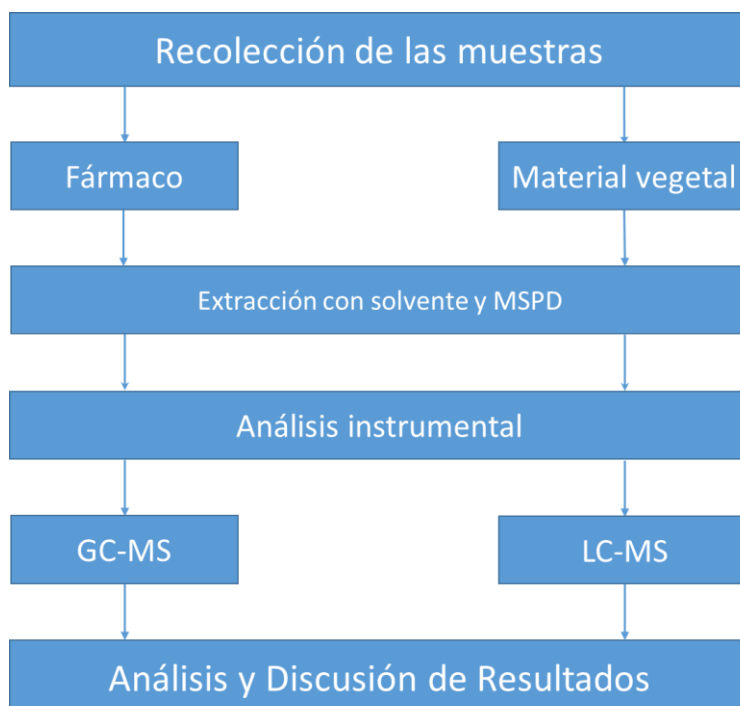


Figura 7. Esquema general del trabajo realizado.

5.1. Materiales, reactivos, solventes y estándares

La **Tabla 2** presenta los materiales, reactivos, solventes y estándares usados durante de la investigación.

Tabla 2. Materiales, reactivos, solventes y estándares.

Solventes	Especificaciones
Metanol	Grado cromatografía de gases, Merck (Darmstadt; Alemania)
Diclorometano	Grado cromatografía de gases, Merck (Darmstadt; Alemania)
Acetonitrilo	Grado cromatografía, Merck (Darmstadt; Alemania)
Isopropanol	Grado cromatografía, Merck (Darmstadt; Alemania)
Acetonitrilo	Grado LC-MS, pureza 99.9%, Merck (Darmstadt; Alemania)
Agua Tipo 1	Sistema de purificación Synergy UV, Millipore S.A.S. (Molsheim, Francia)
Reactivos	
Ácido clorhídrico	Grado analítico, Merck (Darmstadt; Alemania)
Hidróxido de sodio	Emplura [®] , Merck (Darmstadt; Alemania)
Gel de sílice <i>modif.</i> C ₁₈	Tamaño de partícula: 40-63 µm, carbono 23%, Silicycle Inc. (Quebec, Canadá)
Diclofenaco de sodio	100%, lote: BCBS5195V, Sigma-Aldrich Merck (Darmstadt; Alemania)
Quercitrina hidratada	≥78%, Sigma-Aldrich Merck (Darmstadt; Alemania)
Materiales y equipos auxiliares	
Vórtex	<i>IKA</i> (Hofheim, Alemania)
Centrífuga	Campac II, Clay Adams (Sparks, Maryland, EE. UU.)

Baño ultrasónico	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania)
Viales de cromatografía	<i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, California, EE. UU.)
Micropipetas	2-20, 0-200, 100-1000 μ L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania)
Balones aforados	2, 5, 25, 100 mL; <i>Scott</i> (Lubbock, Texas, EE.UU.)
Vasos de precipitado	50, 100 mL; <i>Scott</i> (Lubbock, Texas, EE.UU.)
Rotoevaporador	Balón fondo redondo (100 mL), Equipo <i>Heidolph</i> G1 (Schwabach, Alemania)
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> PB 1502-S (Nänicon, Suiza)
Consumibles	Jeringas, cónicos, filtros 0,22 μ m

5.2. Recolección de las muestras

5.2.1. Obtención de la planta de caléndula. El material vegetal correspondiente a la planta de *Calendula officinalis*, se compró en la plaza de Mercado Central de Bucaramanga; se consiguió material vegetal fresco y con una alta cantidad de flores. Parte del material vegetal se separó y se secó con el propósito de enviarlo al herbario de la UIS, para su identificación.

5.2.2. Consecución del fitofármaco. El fitofármaco se adquirió en siete droguerías de cadena de Bucaramanga, a saber: Droguería Farmakos S.A.S., Drogas La Rebaja, Droguería Vida, Droguería Alemana, Droguería La Economica, Distribuidora Pasteur, Drogas Pague Menos; y una caja adicional se compró en una tienda naturista llamada Nueces & Semillas, dando como resultado un total de ocho cajas del fármaco, entre las cuales había cuatro lotes de producción

distintos (F500, F463, F460 y F333; Véase Anexo 1). Las cajas del fitofármaco se almacenaron con su respectiva factura de venta en bolsas separadas, siguiendo los protocolos estipulados para la trazabilidad y cadena de custodia.

5.3. Determinación del peso promedio de las grageas del fitofármaco.

Para determinar el peso promedio de las grageas del fitofármaco, se tomaron diez grageas de cajas diferentes y se pesaron, lo cual arrojó un peso promedio de una gragea de $0,59 \pm 0,03$ g.

5.4. Liofilización del material vegetal

El agua se extrajo del material vegetal en un liofilizador de bandejas (*Virtis Advance Plus, SP scientific*, New York, EE.UU.). Posteriormente, el material vegetal se redujo en tamaño empleando una licuadora (Oster, ref: BPST02-B00-012, *Sunbeam Products. Inc.*, Tlanepantla, México) y, por último, se almacenó en un congelador a -20 °C, hasta su extracción.

5.5. Obtención de extractos

5.5.1. Extracción de metabolitos secundarios.

5.5.1.1. Extracción sólido-líquido. El procedimiento empleado para la extracción sólido-líquido de los compuestos presentes en el fitofármaco fue, según descrito por Panusa, A. et al. (2007) [23]. Se utilizaron etanol, diclorometano, un medio acuoso acidificado con HCl ($\text{pH} < 1$) y otro basificado con NaOH ($\text{pH} > 13$) como solventes, para verificar, la mejor condición de extracción. En el caso de la extracción con diclorometano y etanol, se pesaron 10 mg del fitofármaco en un tubo cónico de 2 mL, se agregó 1 mL del solvente, se agitó por 10 s y se sonicó por 10 min. Terminado el proceso de sonicación, se centrifugó por 10 min y se filtró (0.22 μm), el filtrado se pasó a un vial de cromatografía para ser analizado su contenido por GC-MS. Para las extracciones a pH ácido y básico se emplearon las mismas metodologías, similares a la descrita anteriormente; con la adición de una etapa, cuando el extracto obtenido a pH ácido o a pH básico, se extrajo dos veces con diclorometano, se secó, se reconstituyó con un mL de diclorometano, se filtró y se analizó por GC-MS.

Para el análisis por LC-*Orbitrap*-MS, el extracto obtenido se diluyó 1×10^{-4} veces hasta tener una concentración *ca.* 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se aforó con la fase móvil (agua:acetonitrilo 80:20, acidificado con ácido fórmico 0.2%).

Para la extracción de los metabolitos secundarios de la planta se usó 1 g de material liofilizado, al cual se le adicionaron 15 mL de etanol, se sonicó durante 90 min a una temperatura de 45 °C, se filtró y la solución se secó en un rotoevaporador. La preparación de la muestra para GC-MS, se realizó pesando 10 mg de extracto seco, que se aforó a 1 mL; para el análisis por LC-*Orbitrap*-MS, se pesaron 0,5 mg del extracto seco, que se aforaron a 1 mL con la fase móvil (agua:acetonitrilo 80:20, acidificado con ácido fórmico 0.2%).

5.5.1.2. Extracción MSPD. El procedimiento empleado para este método de extracción fue similar al descrito por Xiao, H. et al. (2004) [50], quienes usaron como adsorbente gel de sílice modificado con C₁₈ en relación 1:4 de material vegetal:agente dispersante y una mezcla de metanol:agua (9:1), como eluyente.

En caso de caléndula, se pesaron 250 mg del material vegetal liofilizado; se agregó un gramo de gel de sílice modificado con C₁₈; la mezcla se pasó a un mortero. Se adicionó un mL de isopropanol y se trituró hasta que se formó una pasta homogénea, que se trasladó a una jeringa, a la cual previamente se le había adicionado un gramo de algodón; se eluyó con cinco mL de la mezcla de metanol:agua (9:1) y el eluato se almacenó en la nevera (-4 °C) para su análisis.

El procedimiento para la extracción MSPD del fitofármaco fue idéntico al descrito anteriormente, donde también se empleó un gramo del fitofármaco.

5.6. Preparación de la curva de calibración

En las **Tablas 3 y 4**, se describen las concentraciones y volúmenes empleados en la preparación de las curvas de calibración para el análisis de diclofenaco por GC-MS y LC-Orbitrap-MS.

Tabla 3. Concentraciones y los volúmenes necesarios en la preparación de la curva de calibración, para el análisis de diclofenaco por GC-MS-SIM.

Concentración de las soluciones de calibración, µg/mL	Concentración de la solución <i>stock</i> , µg/mL	Volumen de la solución <i>stock</i> , µL	Volumen de aforo, mL
10	1000	2	1

50	1000	10	1
100	1000	20	1
200	1000	40	1
250	1000	50	1
300	1000	60	1
400	1000	80	1

Tabla 4. Concentraciones y los volúmenes necesarios en la preparación de la curva de calibración, para el análisis de diclofenaco por LC-Orbitrap-MS.

Concentración de las soluciones de calibración, $\mu\text{g/L}$	Concentración de la solución <i>stock</i>, $\mu\text{g/mL}$	Volumen de la solución <i>stock</i>, μL	Volumen de aforo, mL
1	0,5	2	1
5	0,5	10	1
10	0,5	20	1
20	5	4	1
30	5	6	1
50	5	10	1
100	5	20	1
200	5	40	1
300	5	60	1
500	5	100	1

5.7. Análisis instrumental

Los extractos obtenidos se analizaron, empleado cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, usando el detector de masas *Orbitrap*. Adicionalmente, se había enviado una muestra del fitofármaco al Laboratorio de Rayos X de la UIS (Véase **Anexo 4**).

5.7.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El análisis cromatográfico de los compuestos extraídos, se llevó a cabo en el cromatógrafo de gases mostrado en la Figura 8, un GC 6890 Plus (*Agilent Technologies*, AT, Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network (AT, Palo Alto, CA, EE.UU.), con ionización por impacto con electrones (EI, 70 eV). El modo de inyección fue *splitless*. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m (L) x 0.25 mm (D.I.) x 0.25 μm (d_f), empleando helio 99.995% (Linde, Bucaramanga) como gas de arrastre. La programación del horno cromatográfico fue desde 45 °C hasta 250 °C, a 6 °C/min, después hasta 300 °C (45 min), a 20 °C/min. La velocidad lineal del gas de arrastre fue 26 cm/s. El volumen de inyección fue 2 μL . Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 250 y 285 °C, respectivamente. Para la cuantificación del diclofenaco se empleó el modo de adquisición Selected Ion Monitoring (SIM, por sus siglas en inglés), donde se usaron, los iones m/z 179, 214, 242 y 277, los cuales son característicos para el diclofenaco [51]. Los datos obtenidos se procesaron con el *software* MSD ChemStation G1701DA (AT, Palo Alto, CA, EE.UU.). Los compuestos de los extractos se identificaron por comparación de sus espectros de masas experimentales y los índices de

retención lineales (IRL), con los de las bases de datos (ADAMS, NIST y WILEY) y reportados en la literatura científica (Adams, 2007) [52], (Babushok, Linstrom y Zenkevich, 2011) [53]. Para calcular los índices de retención lineales (IRL), se emplearon los tiempos de retención de *n*-parafinas, C₁₀-C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. El cálculo se realizó mediante la Ecuación 1, así:

$$IRL = (100x n) + 100 \left(\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

n: Número de átomos de carbono de la *n*-parafina que eluye antes del compuesto de interés.

N: Número de átomos de carbono de la *n*-parafina que eluye después del compuesto de interés.

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{Rn}: Tiempo de retención de la *n*-parafina que eluye antes del compuesto de interés.

t_{RN}: Tiempo de retención de la *n*-parafina que eluye después del compuesto de interés.



Figura 8. Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas AT MSD 5973 Network. Fuente: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 22 de diciembre de 2018.

5.7.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con detector de masas *Orbitrap* e interfaz de electronebulización. Para el análisis de los compuestos extraídos de las muestras se usó un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC) Dionex™ UltiMate™ 3000 (*Thermo Scientific*, Germering, Alemania) (Figura 9), equipado con un degasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG-3400RS), un inyector automático (WPS-300TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC-3000RS). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Hypersil GOLD™ aQ (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm d.i., 1.9 μm de tamaño de partícula). La unidad termostataada se mantuvo a 30 °C. La fase móvil fue ácido fórmico al 0,2 % en agua (A) y ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo (B). La condición inicial de gradiente fue 100% de A cambiando

linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante durante 4 min, se regresó a 100% A en 1 min y, se mantuvo sin modificar durante 3 min. El flujo fue 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el volumen de inyección, 1 μL . El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas *Orbitrap*TM Exactive Plus (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) a través de una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), operada en modo positivo o negativo a 350 °C. El nitrógeno (>99%) para la HESI-II se obtuvo en un generador NM32LA (*Peak Scientific*, Scotland, Reino Unido). La temperatura del capilar fue 320 °C y un voltaje de $\pm 3,5$ kV. El nitrógeno usado como gas *sheath* y gas auxiliar se ajustó a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente.

La resolución del detector *Orbitrap* para el modo de escaneo completo (*Full MS Scan*) se ajustó a 70 000 (*Full-Width-at-Half-Maximum*, a m/z 200, R_{FWHM}) usando un control de ganancia automático (AGC) de 3×10^6 y un tiempo de inyección en la cámara C-Trap de 200 ms. Los analitos ionizados se fragmentaron a diferentes energías (10, 20, 30 o 40 eV) en la celda de colisiones HCD (*High Energy Collisional Dissociation Cell*) en el modo de escaneo por pasos (*Stepped-Scan*). Los espectros de masas se registraron en el modo AIF (*All-Ion Fragmentation*) para cada energía de colisión, a una resolución R_{FWHM} de 35 000, usando un AGC de 3×10^6 y un tiempo de inyección a la cámara C-Trap de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de m/z 80–1000. El detector *Orbitrap* se calibró con la solución de referencia, preparada en el laboratorio, que contenía *n*-butilamina (471305, *Sigma-Aldrich*), dodecilsulfato de sodio (L4509, *Sigma-Aldrich*), taurocolato de sodio hidratado (T4009, *Sigma-Aldrich*), cafeína (C6035, *Sigma-Aldrich*), acetato de Met-Arg-Phe-Ala (M1170, *Sigma-Aldrich*) y una solución estándar UltramarkTM 1621 Mass Spec (AB172435, ABCR GmbH & Co. KG). La solución de calibración se preparó en acetonitrilo:metanol:agua con 1 % de ácido acético, siguiendo el procedimiento descrito en el manual

de operaciones del *OrbitrapTM Exactive Plus* (*Thermo Fisher Scientific*, P/N 1323060, Revision A, 2012).

Los datos obtenidos se analizaron usando el *software* Thermo XCalibur v3.1 (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE.UU.). La identificación de los compuestos se realizó con base en la corriente iónica extraída (EIC, por sus siglas en inglés), su composición elemental, la relación isotópica y patrones de fragmentación. En el caso de diclofenaco, se usó sustancia de referencia certificada.



Figura 9. Cromatógrafo líquido UHPLC Dionex Ultimate 3000, acoplado a espectrómetro de masas *Orbitrap* Exactive Plus, con interfaz de electronebulización. CENIVAM, Laboratorio Alexander Makarov. UIS. Bucaramanga, 22 de diciembre de 2018.

6. Resultados y discusión.

6.1. Análisis por GC-MS de los extractos de caléndula y del fitofármaco.

EL análisis de los compuestos presentes en los extractos obtenidos de *C. officinalis* y el fitofármaco, se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en la **Sección 3.6.1**. La identificación tentativa se realizó comparando los espectros de masas experimentales con los reportados en la base de datos *NIST 11*, con una coincidencia mayor de 90%, también, se usaron los índices de retención lineales.

En el extracto de caléndula, analizado por GC-MS, se logró identificar nueve compuestos con un área relativa superior al 2% (**Tabla 5**); en su mayoría, los compuestos fueron sesquiterpenos de la familia de los cadinanos, como el muuroleno y el cadineno, que están presentes en gran variedad de plantas, pero en concentraciones más bajas. También, se identificó un compuesto de la familia del oplopano, la oplopanona, y un éster del ácido linoleico. En la **Figura 10** se muestra el perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de un extracto etanólico de *C. officinalis*. El compuesto mayoritario presente en el extracto fue un compuesto derivado del ácido oleico, la oleamida, que se puede encontrar tanto en animales, como en plantas, y se ha reportado que actúa como un inductor de sueño [54] y como cannabinoide endógeno [55]. Estos compuestos fueron reportados previamente por Kaškonienė, *et al.* (2011) [56].

En el extracto no se pudieron identificar los compuestos con tiempos de retención mayores de 53 min, debido a una subida de la línea base y por la presencia de iones “basura” en sus espectros de masas; posiblemente, estos compuestos son diterpenos y triterpenos (C₂₀, C₃₀).

Tabla 5. Metabolitos secundarios encontrados en el extracto etanólico de *C. officinalis*.

N° en Figura 10	Compuesto	Índices de retención lineales, DB-5MS		Cantidad relativa, %
		Exp.	NIST 11	
1	<i>p</i> -Xileno	871	872	3,4
2	3-Metiltridecano	1366	1371	7,9
3	Tetradecano (<i>istd</i>)	-	-	-
4	γ -Muuroleno	1480	1478	2,2
5	α -Muuroleno	1502	1500	3,8
6	γ -Cadineno	1519	1513	3,4
7	δ -Cadineno	1522	1522	3,5
8	Viridiflorol	1604	1592	2,6
9	α -Cadinol	1663	1652	5,4
10	β -Eudesmol	1666	1649	3,8
11	Oplopanona (C ₁₅ H ₂₆ O ₂)	1744	1739	2,4
13	Linoleato de metilo	2095	2098	2,8
14	Fitol	2104	2104	2
15	Oleamida (C ₁₈ H ₃₅ NO)	2362	2375	12,5
16	N.I.	2805	-	3,4
17	N.I.	2868	-	4
18	N.I.	2926	-	3,8
19	N.I.	2967	-	10,4
20	N.I.	2978	-	8,3
21	Vitamina E	3102	3100	3,7

N.I. - Compuesto no identificado.

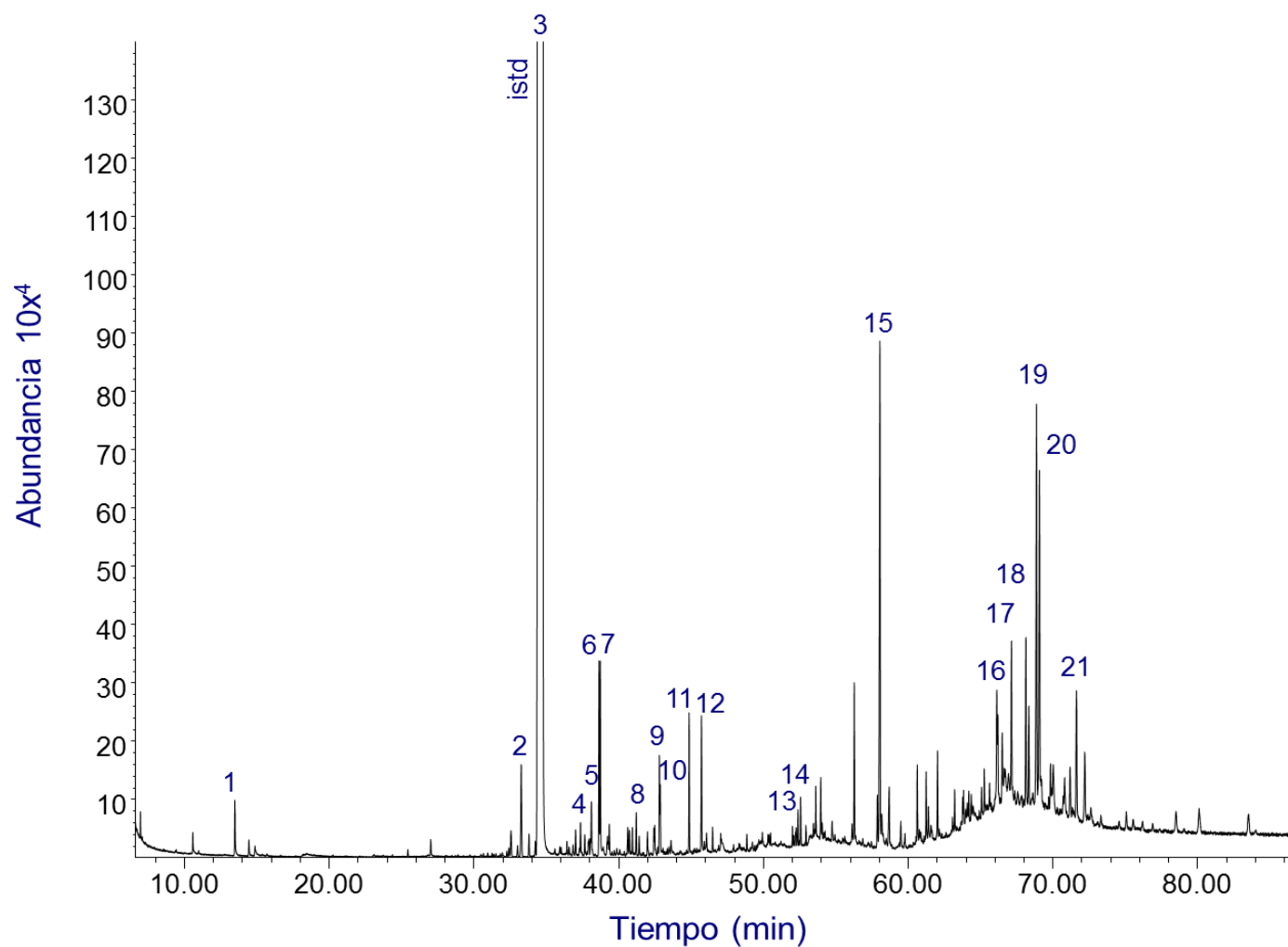


Figura 10. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS del extracto de flores de caléndula. Columna DB-5MS, 60 m. Splitless. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos en la Tabla 5.

En la **Sección 3.4.1.1.** se describe el procedimiento para obtener los extractos del fitofármaco. Los resultados de las pruebas con diferentes solventes se observan en el **Anexo 2**, donde se aprecia que en el extracto obtenido en medio básico, no se detectaron compuestos; en medio ácido, se lograron extraer los compuestos correspondientes a los picos 2 y 4 **Figura 11**, y que, realizando una extracción directa con etanol, se obtuvo una mayor respuesta al compuesto 5.

En el extracto obtenido del fitofármaco empleando un medio ácido, se logró la identificación de seis compuestos, de los cuales cuatro fueron derivados del diclofenaco o productos de su degradación [57, 58]. Las otras dos sustancias resultaron ser ácidos orgánicos. En la **Figura 11**, se muestra el perfil cromatográfico del extracto etanólico del fitofármaco y en la **Tabla 6** se observan los compuestos en él identificados. El compuesto mayoritario fue amida del diclofenaco, también conocido como impureza A del diclofenaco, con número CAS: 15362-40-0, un análogo con masa molecular en m/z 278, formado por la pérdida de una molécula de agua, seguida de una ciclación. El segundo compuesto con mayor área cromatográfica se identificó como diclofenaco. Los picos 2 y 4 (**Figura 11**) pertenecen a compuestos formados por la degradación del diclofenaco, previamente reportados por Kosjek, T., *et al.* (2007) [58]. En la **Figura 12**, se muestran las estructuras del diclofenaco y sus derivados.

En la **Figura 13** se presenta el espectro de masas del pico identificado como diclofenaco **Tabla 6** y en la **Figura 14** su ruta de fragmentación propuesta. En el espectro de masas del diclofenaco se observan ion M^+ con m/z 295, seguido de $[M-H_2O]^+$ en m/z 277, $[M-H_2O-Cl]^+$ en m/z 242, $[M-H_2O-Cl-CO]^+$ en m/z 214, siendo éste el ion pico de base, seguido de $[M-H_2O-Cl-CO-Cl]^+$ en m/z 179. En el espectro de masas de la amida del diclofenaco (**Figura 15**), se pueden observar los mismos iones en m/z 277, 242, 214 y 179, que están presentes en el espectro de masas del diclofenaco **Figura 13**.

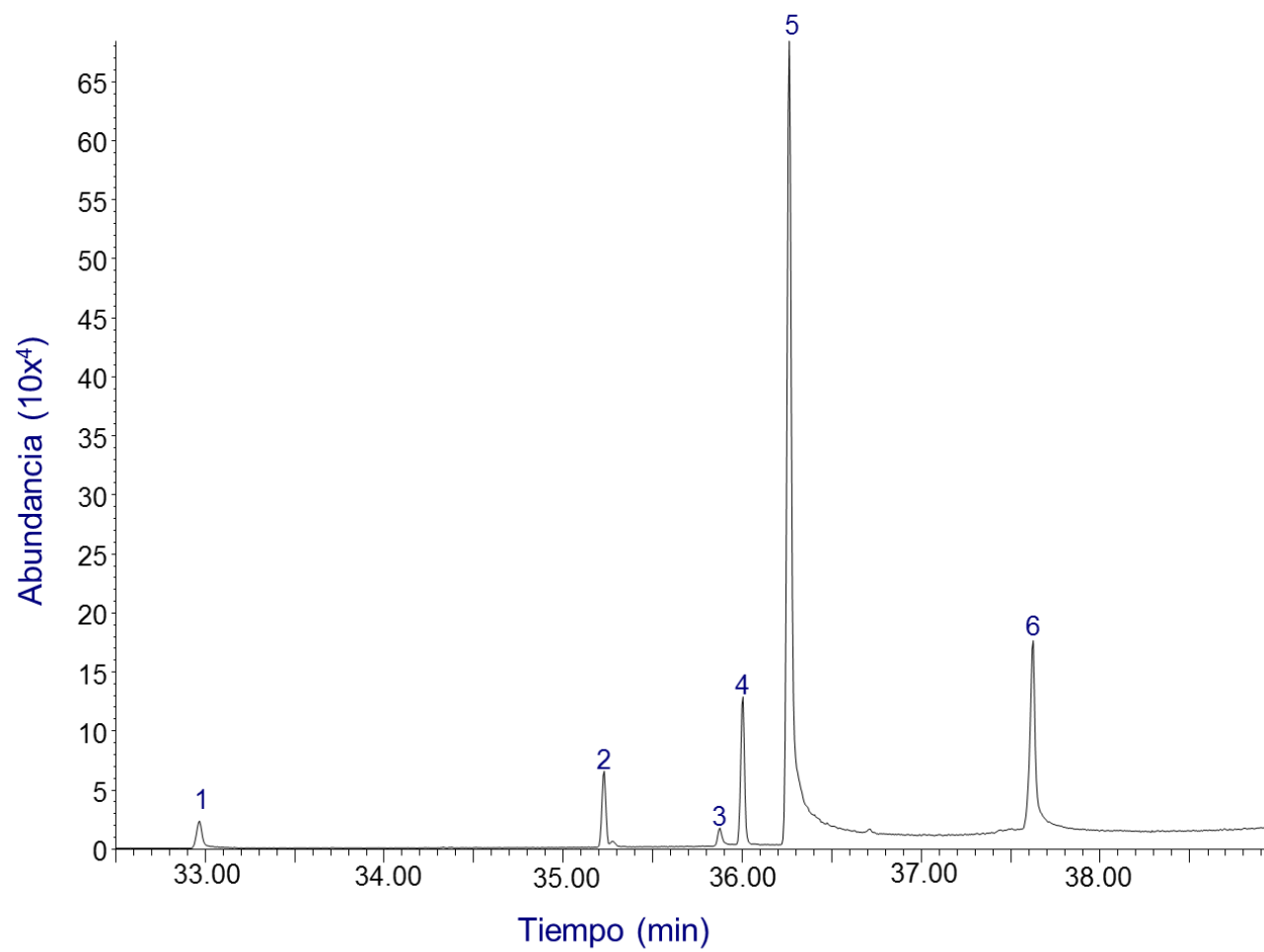


Figura 11. Perfil cromatográfico GC-MS del extracto del fitofármaco obtenido en medio ácido. Columna DB-5MS, 60 m. Splitless.

MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los compuestos en la Tabla 6.

Tabla 6. Compuestos identificados presentes en el extracto etanólico del fitofármaco bajo estudio.

N° Figura 11	en Compuesto	Índices de retención lineales, DB-5MS		Cantidad relativa, %
		Exp.	Lit [52]	
		1	Ácido hexadecanoico	1996
2	2-(2,6-Dicloroanilino)benzaldehído [57]	2149	-	3,9
3	Ácido octadecanoico	2202	2187	1,1
4	Alcohol-2-(2,6-diclorofenilamino)bencílico [58]	2214	-	8,0
5	Amida de diclofenaco [58]	2240	-	66,7
6	Diclofenaco	2383	2495	18,1

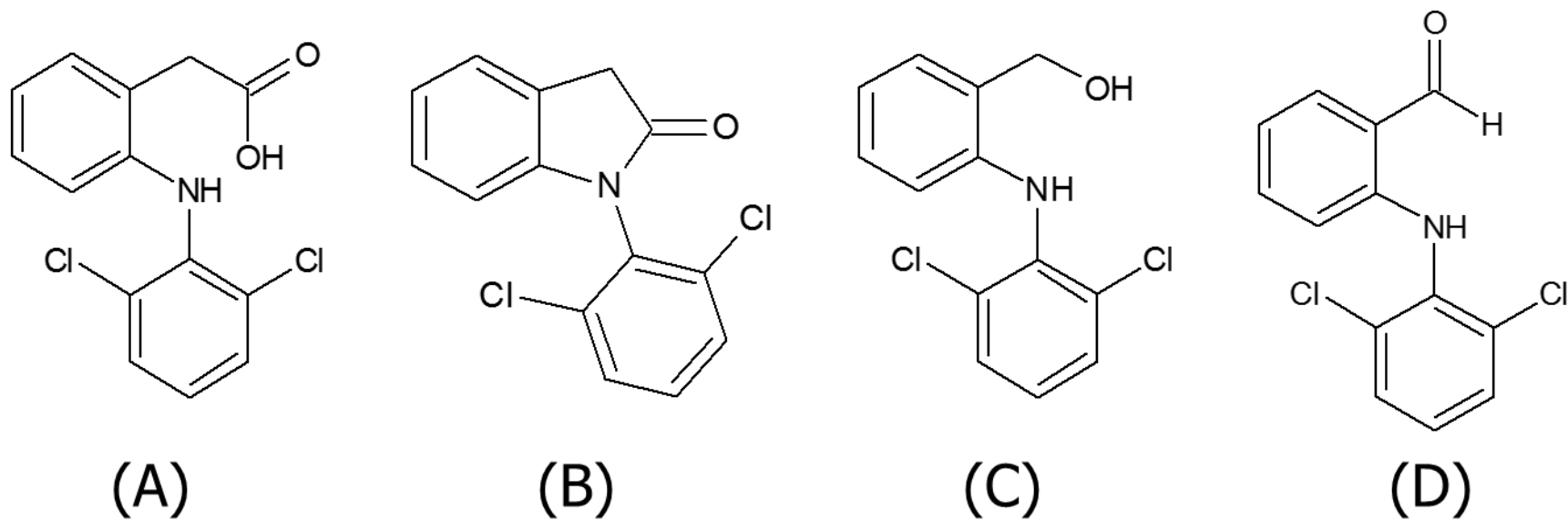


Figura 12. Diclofenaco y compuestos derivados detectados en el extracto del fitofármaco: A. Diclofenaco; B. Amida del diclofenaco [1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona]; C. Alcohol-2-(2,6-diclorofenilamino)benzílico; D. 2-(2,6-Dicloroanilino)benzaldehído.

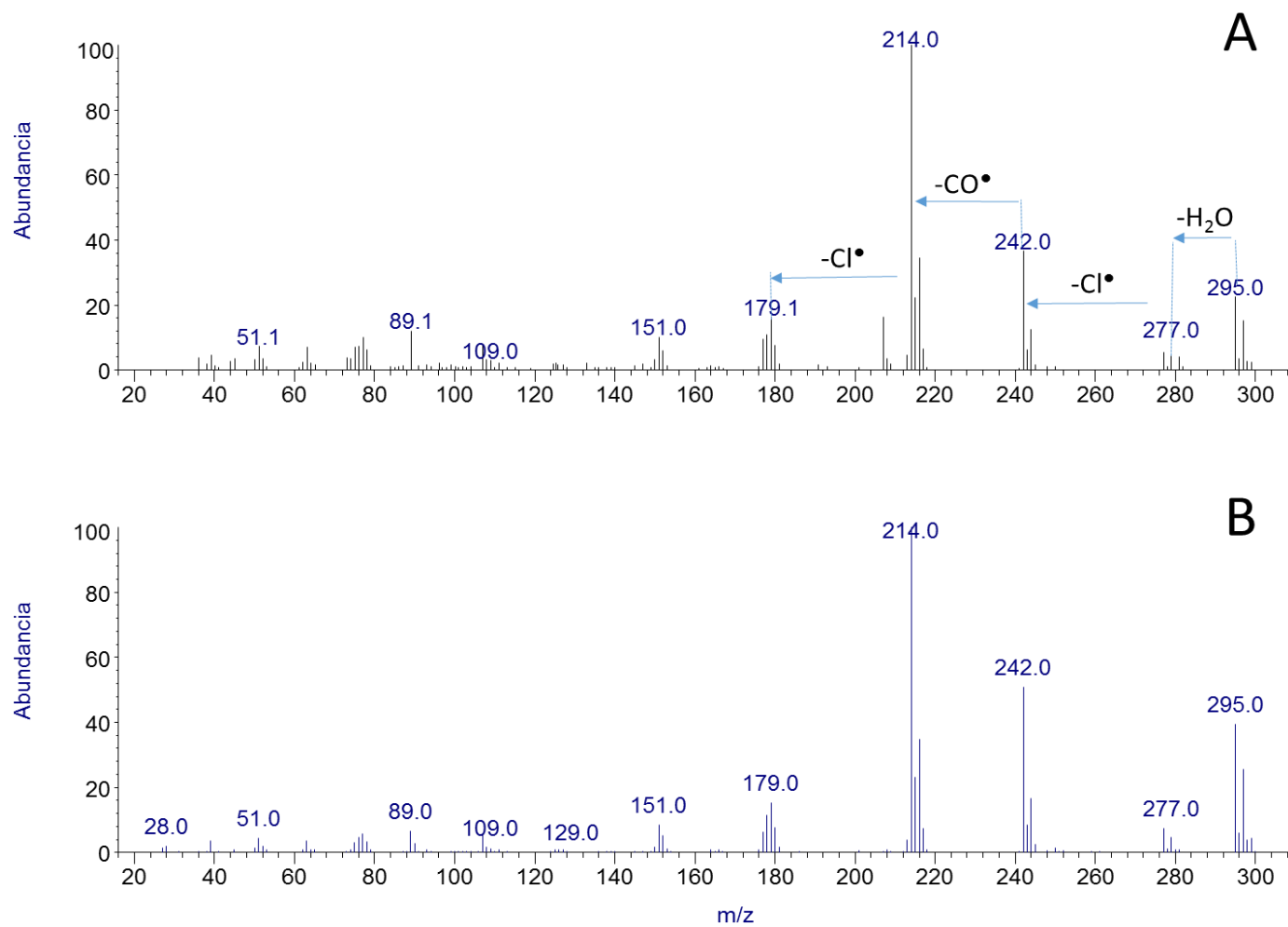


Figura 13. Espectros de masas: A. Obtenido experimentalmente por GC-MS (pico número 6, Figura 11), identificado como diclofenaco y B. Espectro de masas de la base de datos NIST.

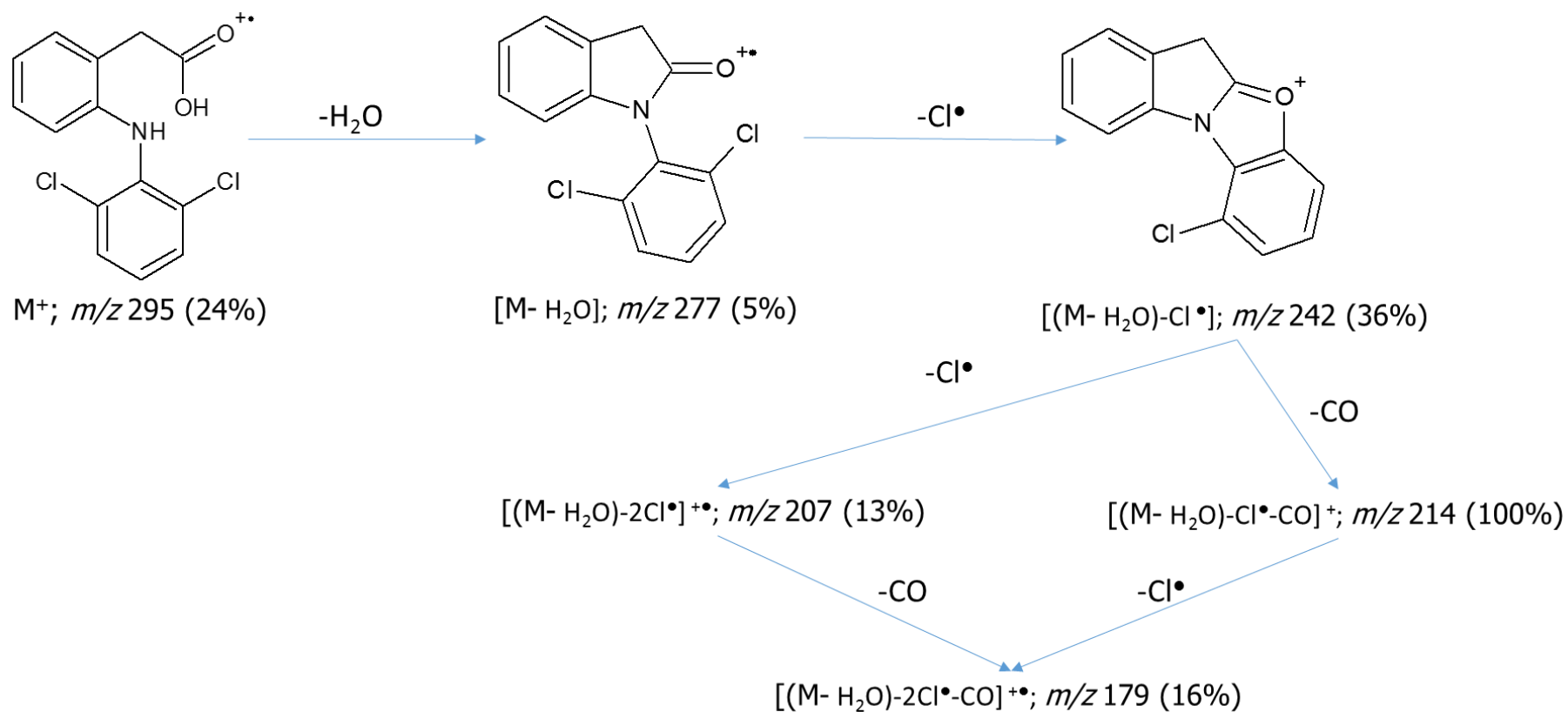


Figura 14. Ruta de fragmentación propuesta para el diclofenaco (MS, EI, 70 eV).

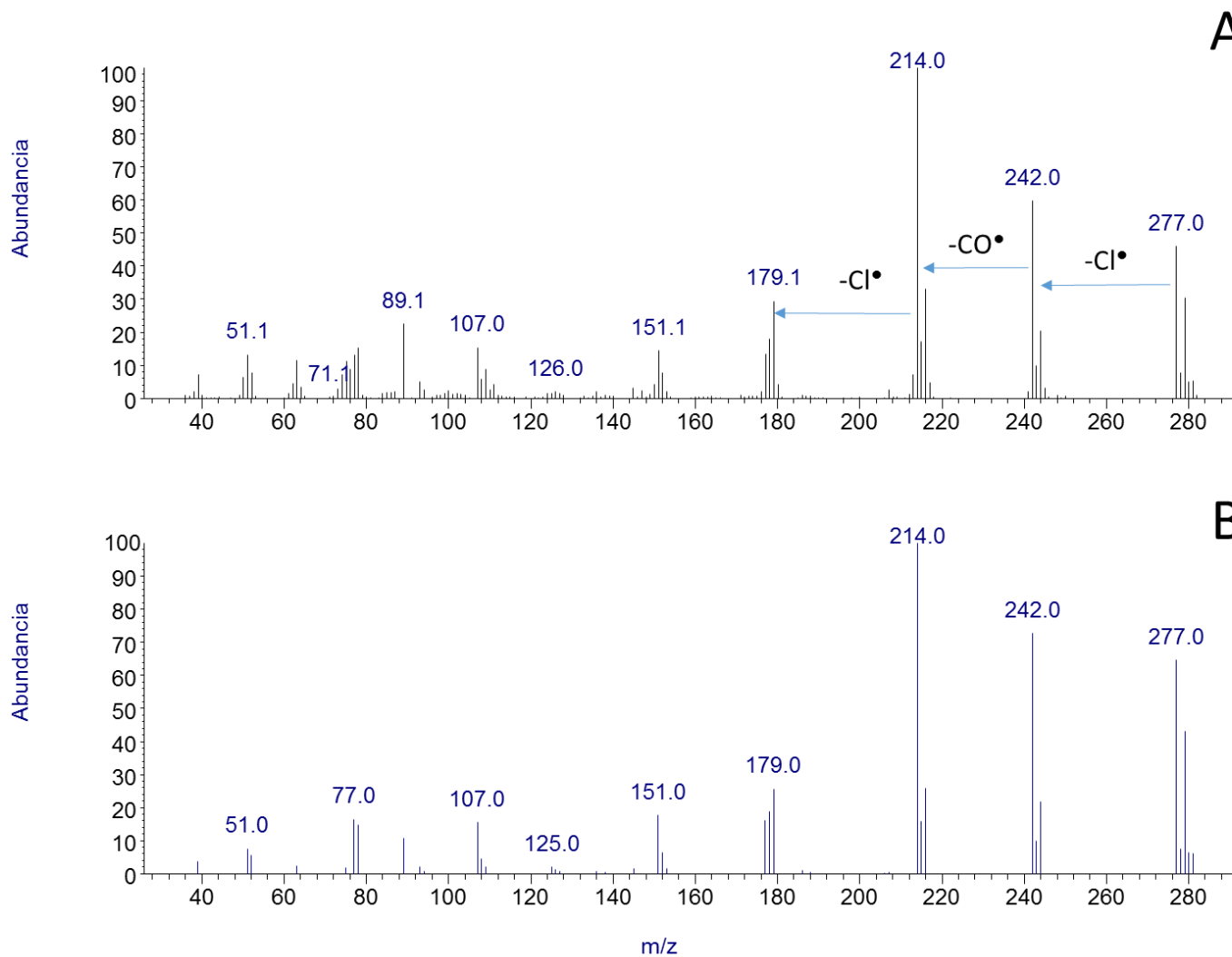


Figura 15. Espectros de masas: A. Obtenido experimentalmente por GC-MS (pico número 5, Figura 11), identificado como amida del diclofenaco y B. Espectro de masas de la base de datos NIST.

6.2. Análisis por LC-Orbitrap-MS del extracto de caléndula.

La identificación de los compuestos presentes en el extracto MSPD de caléndula y del fitofármaco, se realizó empleando los parámetros operacionales descritos en la **Sección 3.6.2**, operando la interfaz HESI-II para la adquisición de iones positivos; la cuantificación se llevó a cabo usando la quercitrina como estándar interno (*istd*) en una concentración de 0,5 mg/L.

En este trabajo, se buscaron flavonoides y triterpenos, presentes en la planta de caléndula, a los cuales se les atribuye actividad antiinflamatoria [19,20]. En la **Tabla 7** se presenta la identificación y la cuantificación de estos compuestos. Como se puede observar, el componente mayoritario del extracto de caléndula fue la narcisina, seguido de tifaneósido y calendoflavósido, compuestos glucosilados, derivados de la isoramnetina. Estos compuestos se encuentran presentes en gran variedad de plantas y poseen, según los estudios la actividad antiinflamatoria. [16, 19, 20].

La **Figura 16** muestra el cromatograma reconstruido con las corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas, en donde se observan los compuestos identificados. **Las Figuras 17-28** muestran las corrientes iónicas extraídas, correspondientes a cada uno de los metabolitos secundarios encontrados y los espectros de masas con la fragmentación propuesta para estos. En los espectros de masas se puede observar que la fragmentación de los metabolitos se da por las pérdidas sucesivas de azúcares hasta llegar a la aglicona.

Tabla 7. Metabolitos secundarios identificados presentes en el extracto MSPD de caléndula.

Compuesto	t_R , min	Masa $[M+H]^+$		Δ ppm	Concentración, $\mu\text{g/g}$
		Calc.	Exp.		
Mangaslina	3,83	757,21857	757,21713	0,76	80 ± 8
Rutina	4,02	611,15760	611,16173	0,87	400 ± 40
Tifaneósido	4,02	771,23422	771,23431	0,83	930 ± 41
Calendoflavósido	4,16	625,17631	625,17747	0,91	710 ± 81
Isoquercetina	4,22	465,10275	465,10268	0,66	96 ± 5
Narcisina	4,33	625,17631	625,17712	0,32	2000 ± 150

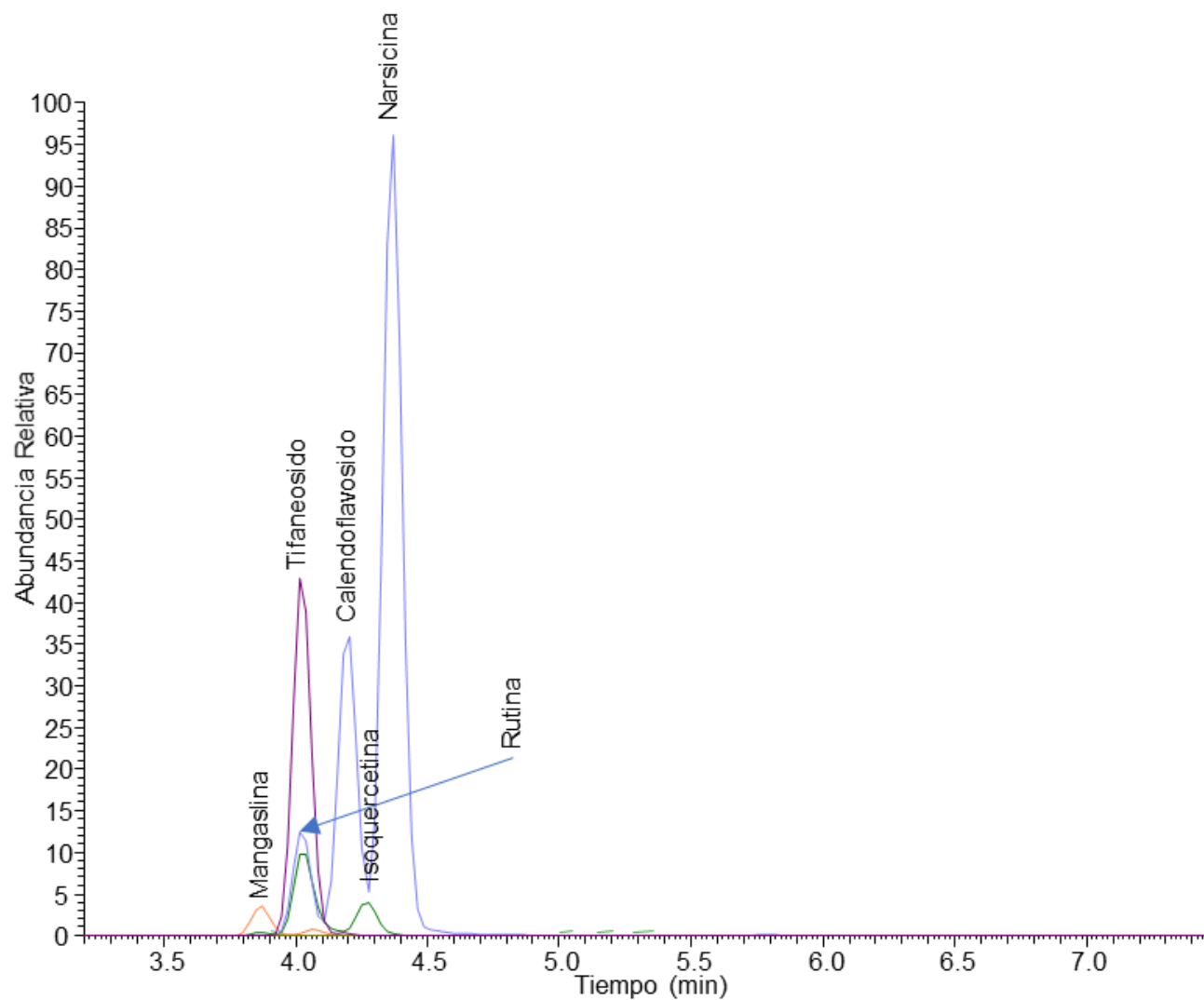


Figura 16. Corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a las moléculas protonadas MH^+ , identificadas en el extracto MSPD de caléndula. La escala absoluta de $4,5 \times 10^6$ fue ajustada (normalizada).

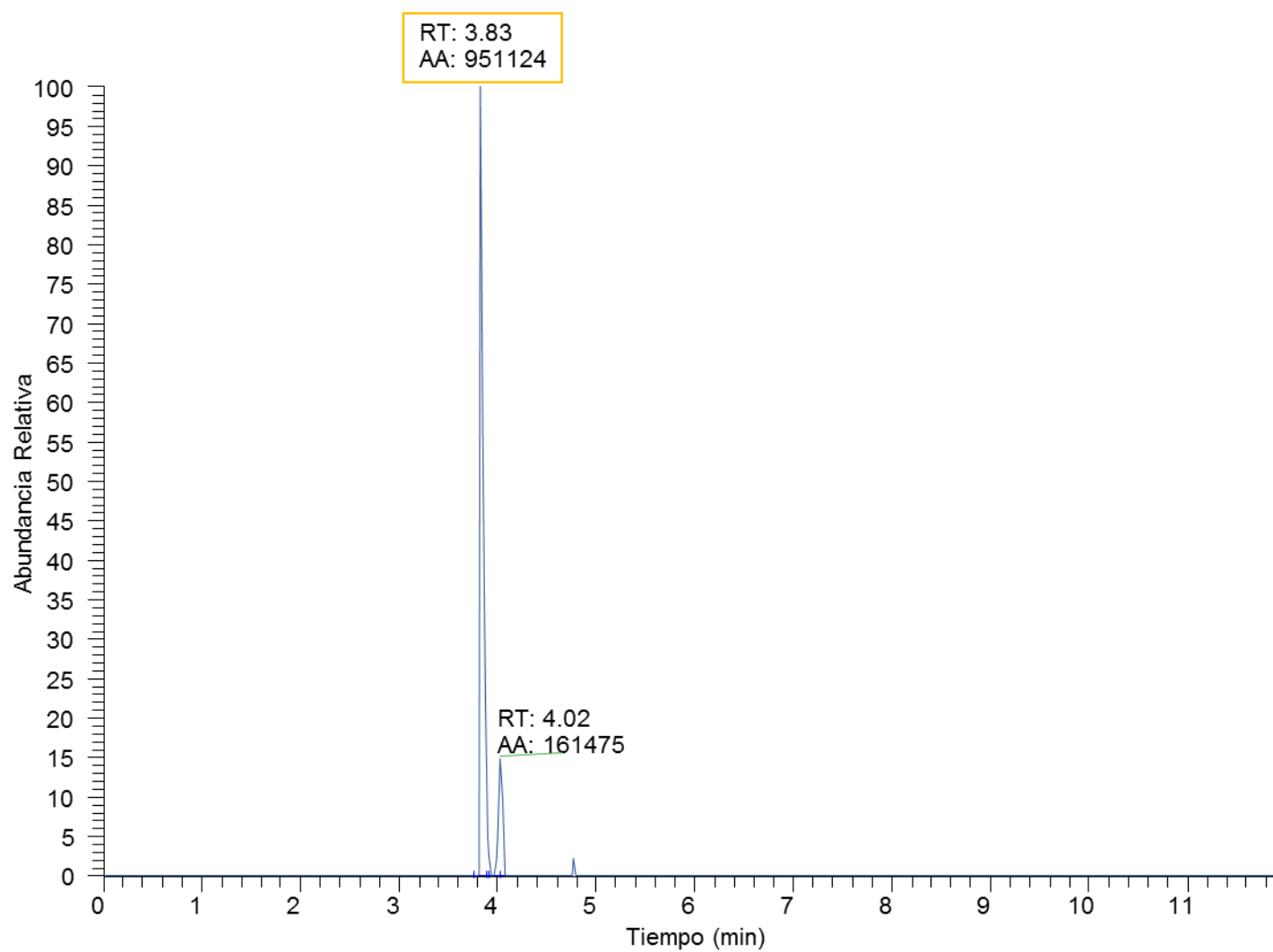


Figura 17. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 757.21713) de la mangaslina ($C_{33}H_{40}O_{20}$), $t_R = 3.83$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS.

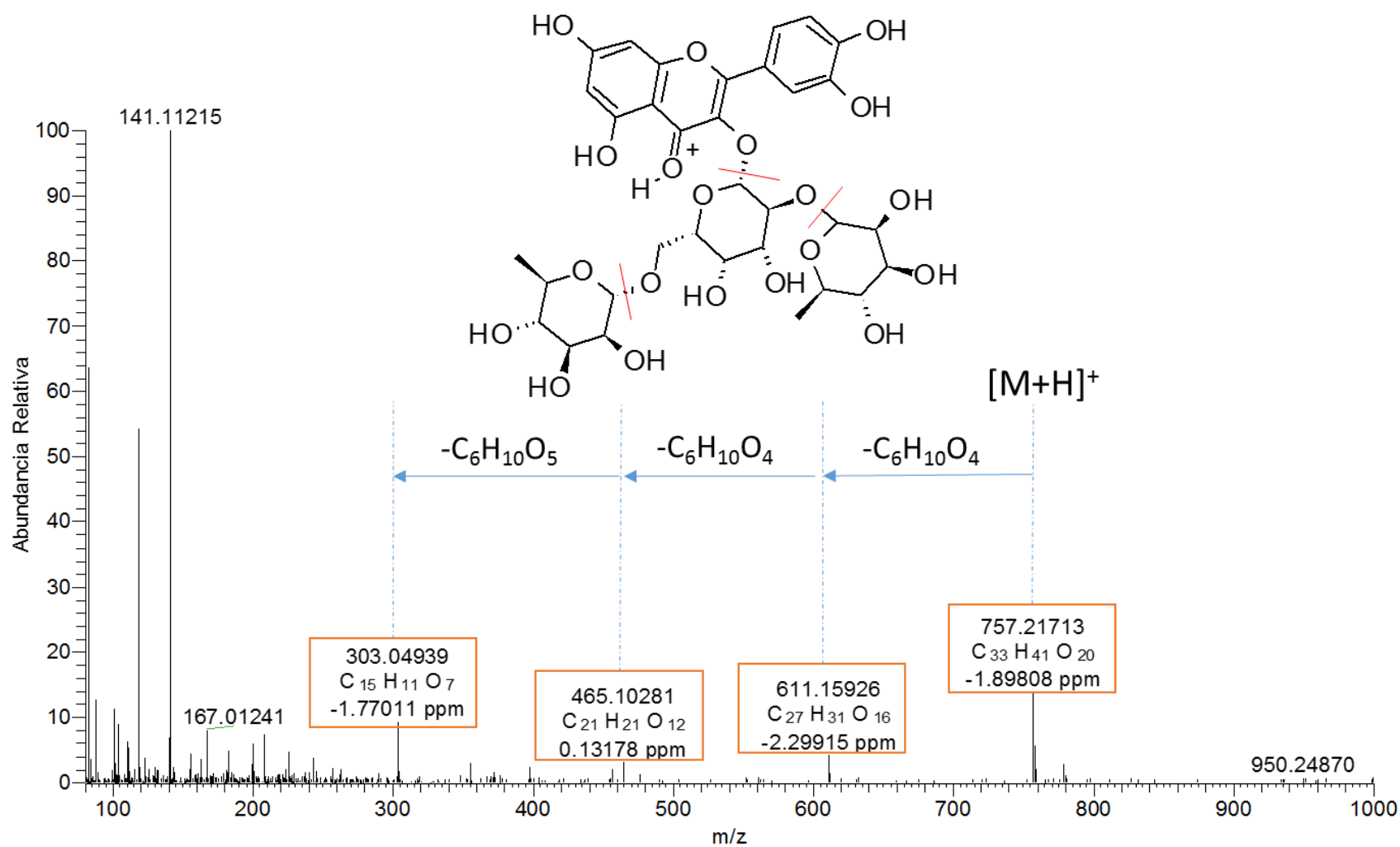


Figura 18. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, de la mangaslina (C₃₃H₄₀O₂₀), t_R = 3.83 min, adquirido en modo *full scan*.

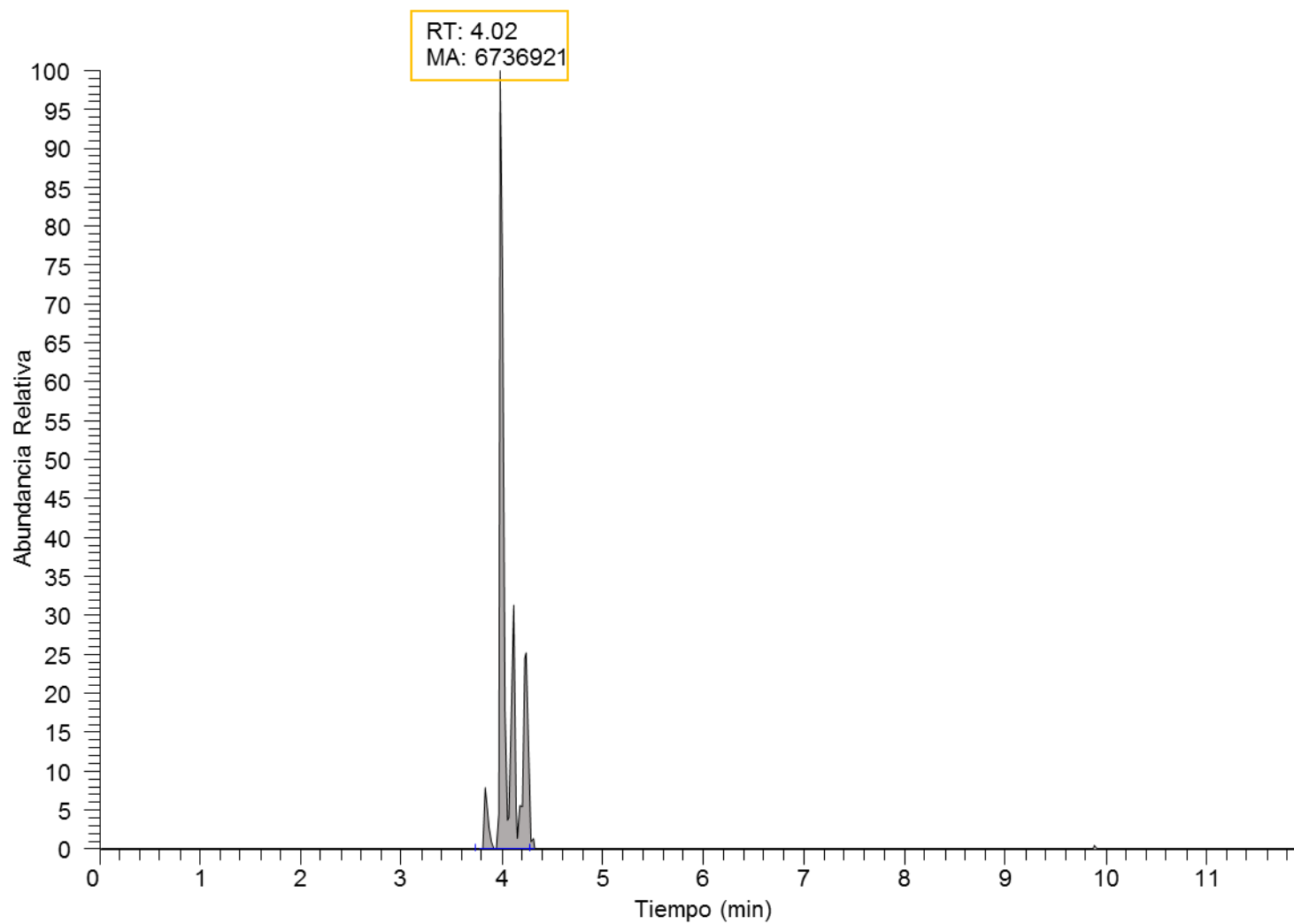


Figura 19. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 611.16173) de la rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$), $t_R = 4.02$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS

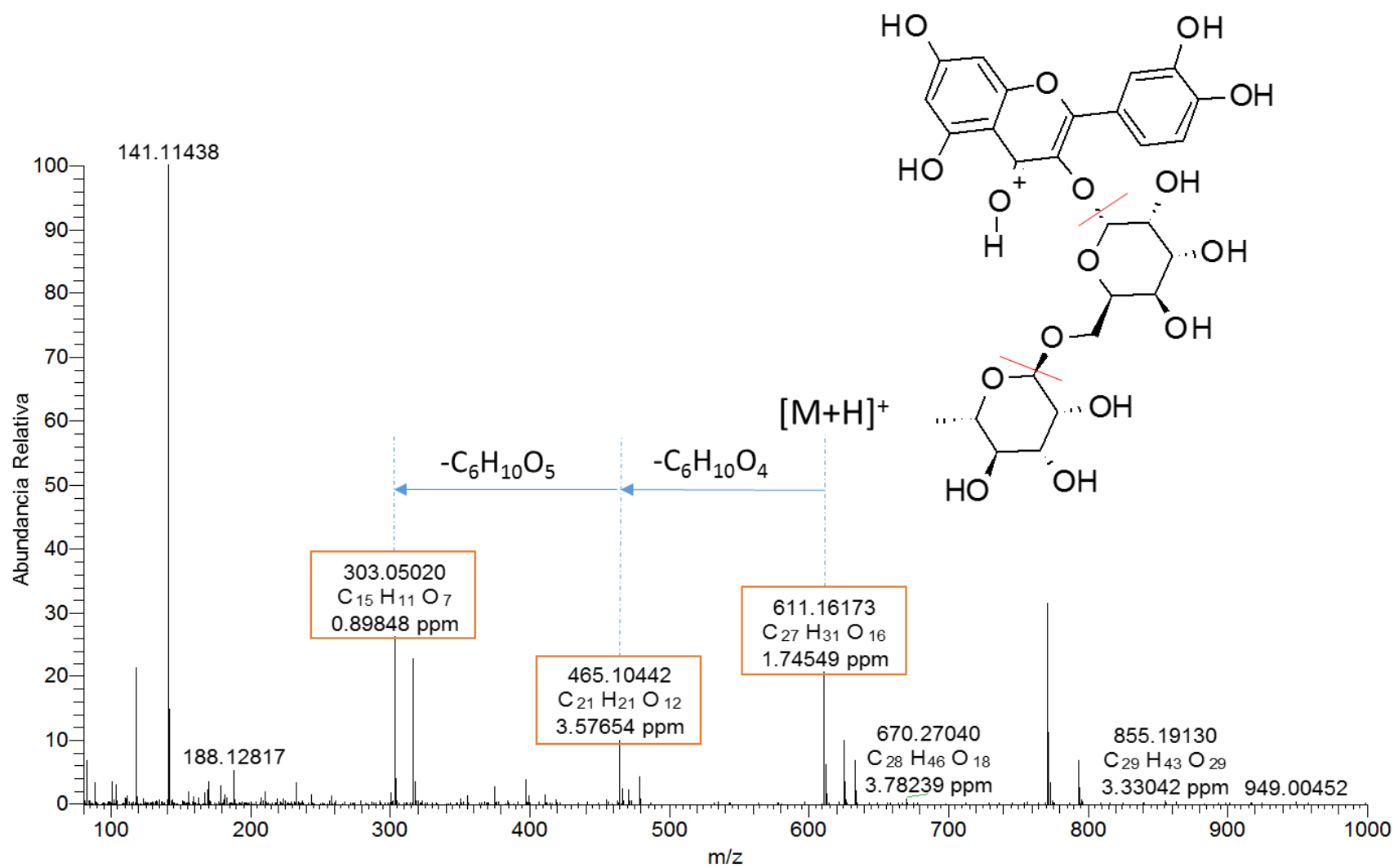


Figura 20. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, de la rutina (C₂₇H₃₀O₁₆), t_R = 3.98 min, adquirido en modo *full scan*.

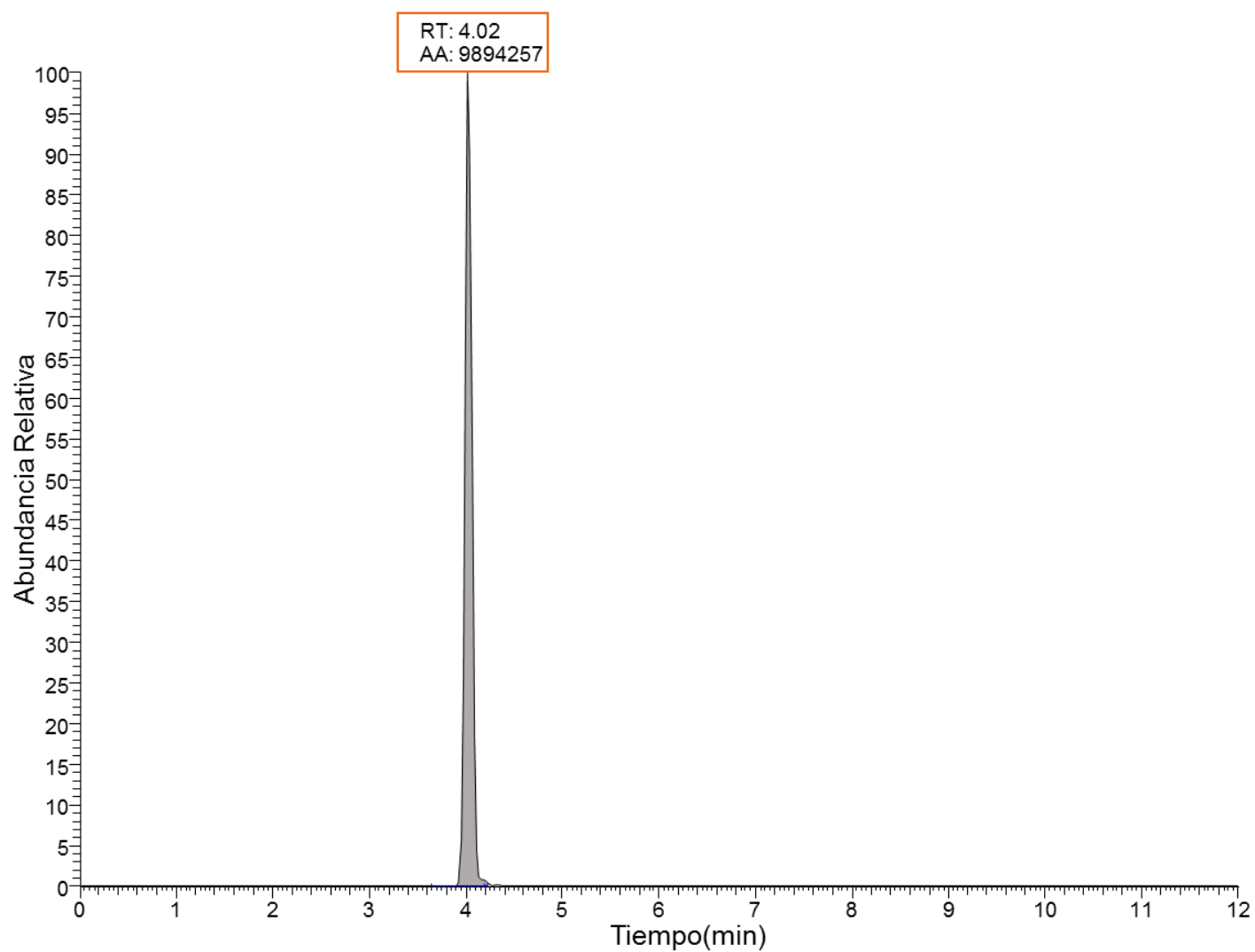


Figura 21. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 771.23431) del tifaneósido ($C_{34}H_{42}O_{20}$), $t_R = 4.02$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS.

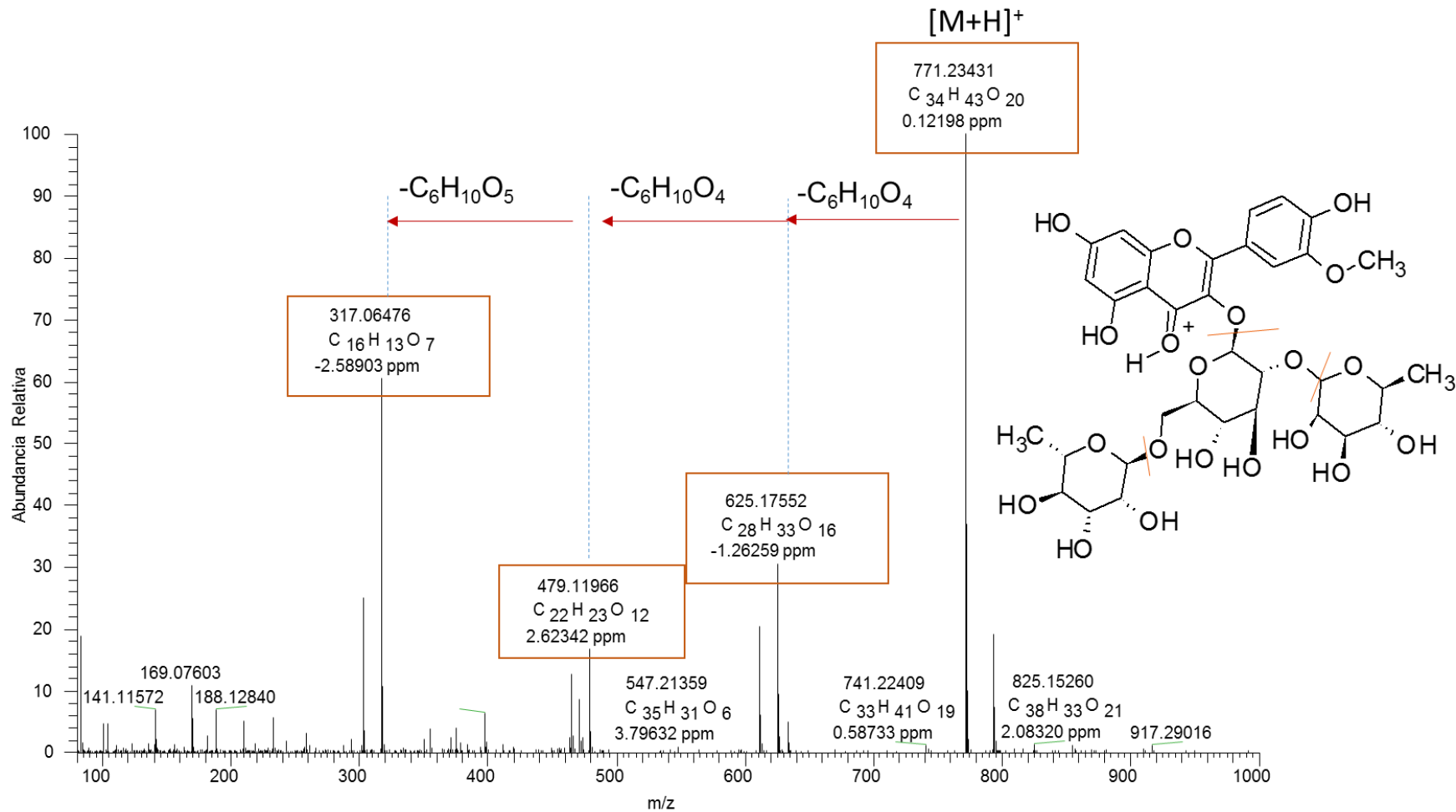


Figura 22. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, del tiffanosido (C₃₄H₄₂O₂₀), t_R = 4.02 min, adquirido en modo *full scan*.

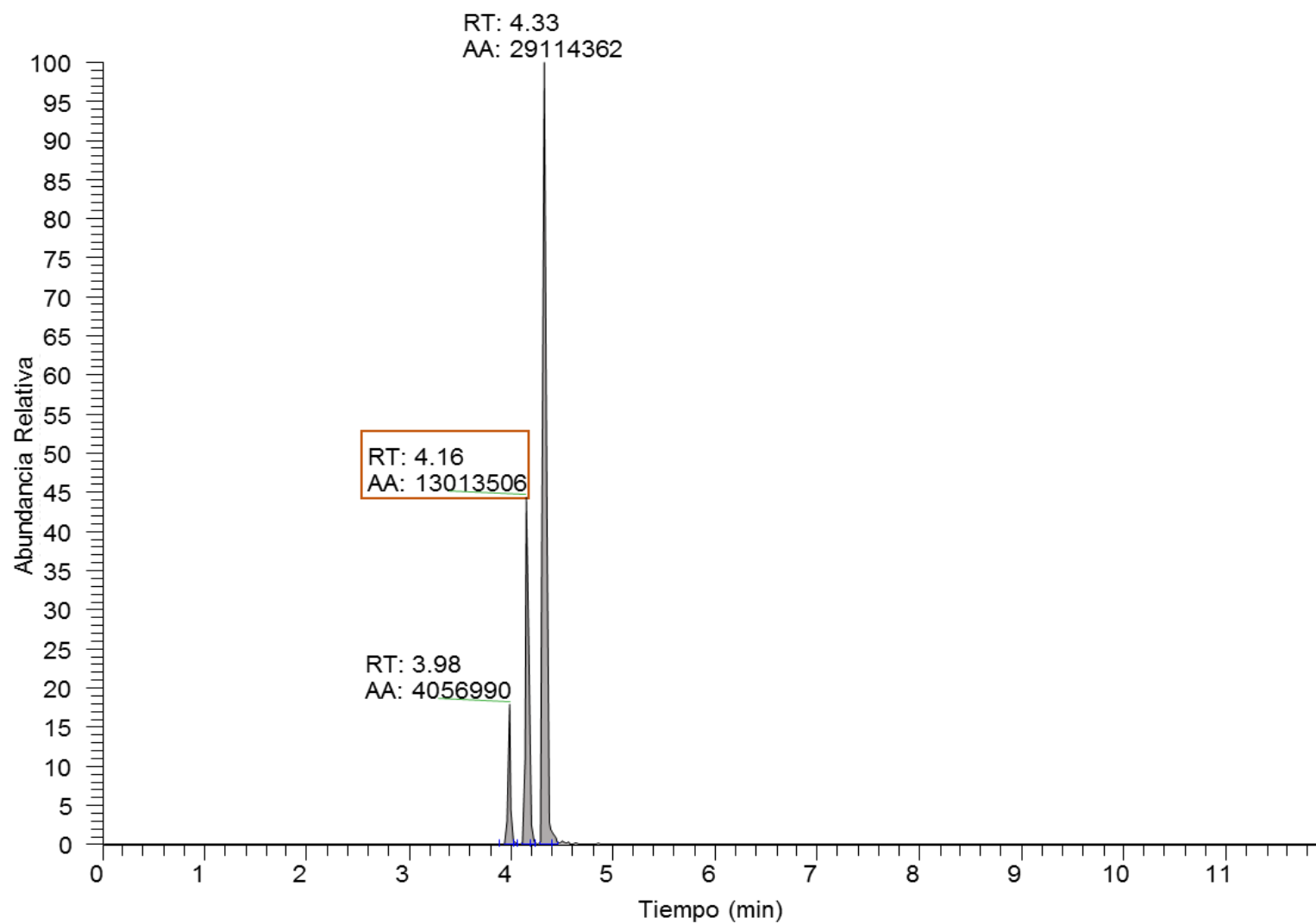


Figura 23. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 625.17747) del calendoflavósido ($C_{28}H_{32}O_{16}$), $t_R = 4.16$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS.

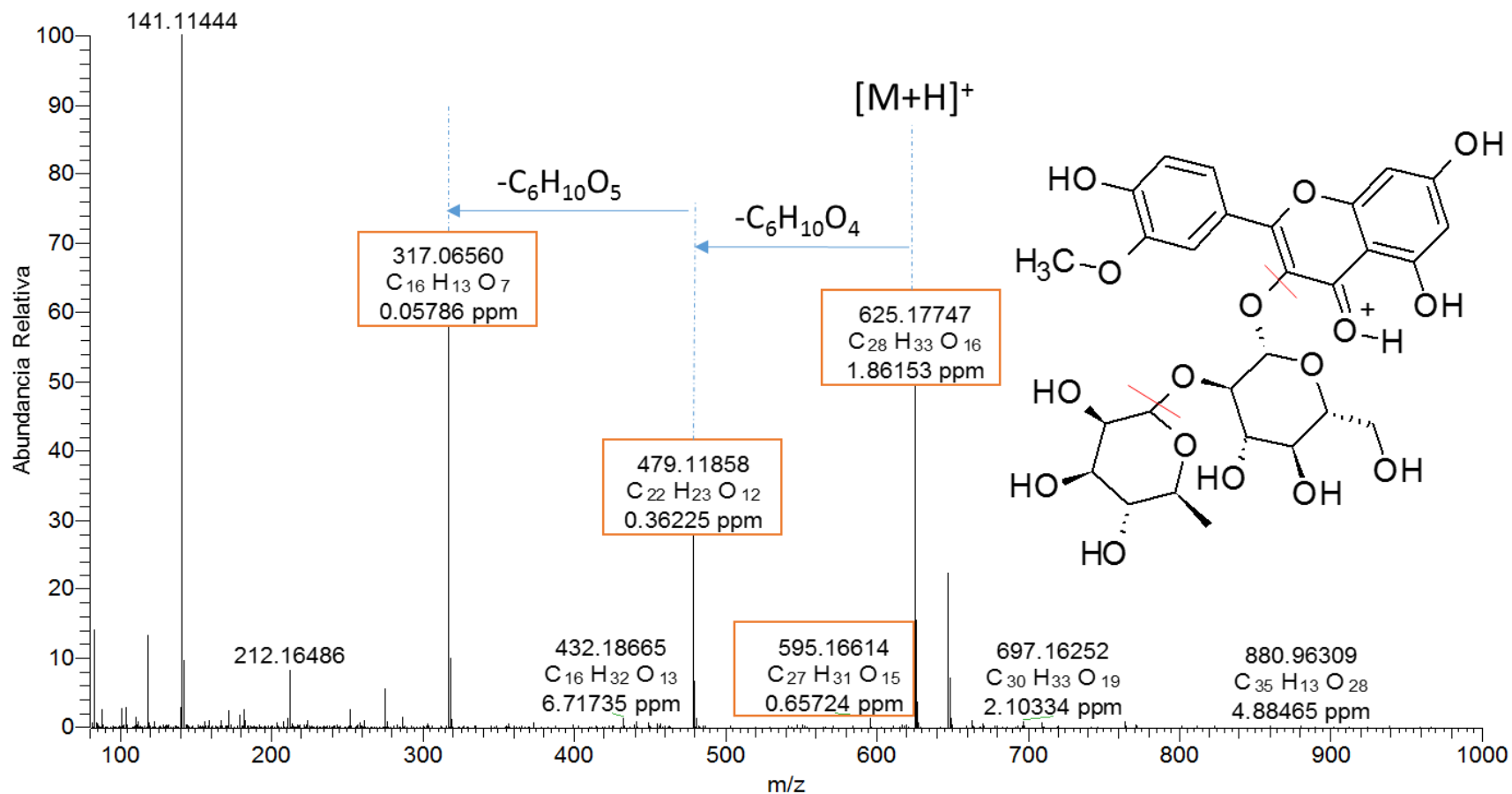


Figura 24. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, del calendoflavósido (C₂₈H₃₂O₁₆), t_R = 4.16 min, adquirido en modo *full scan*.

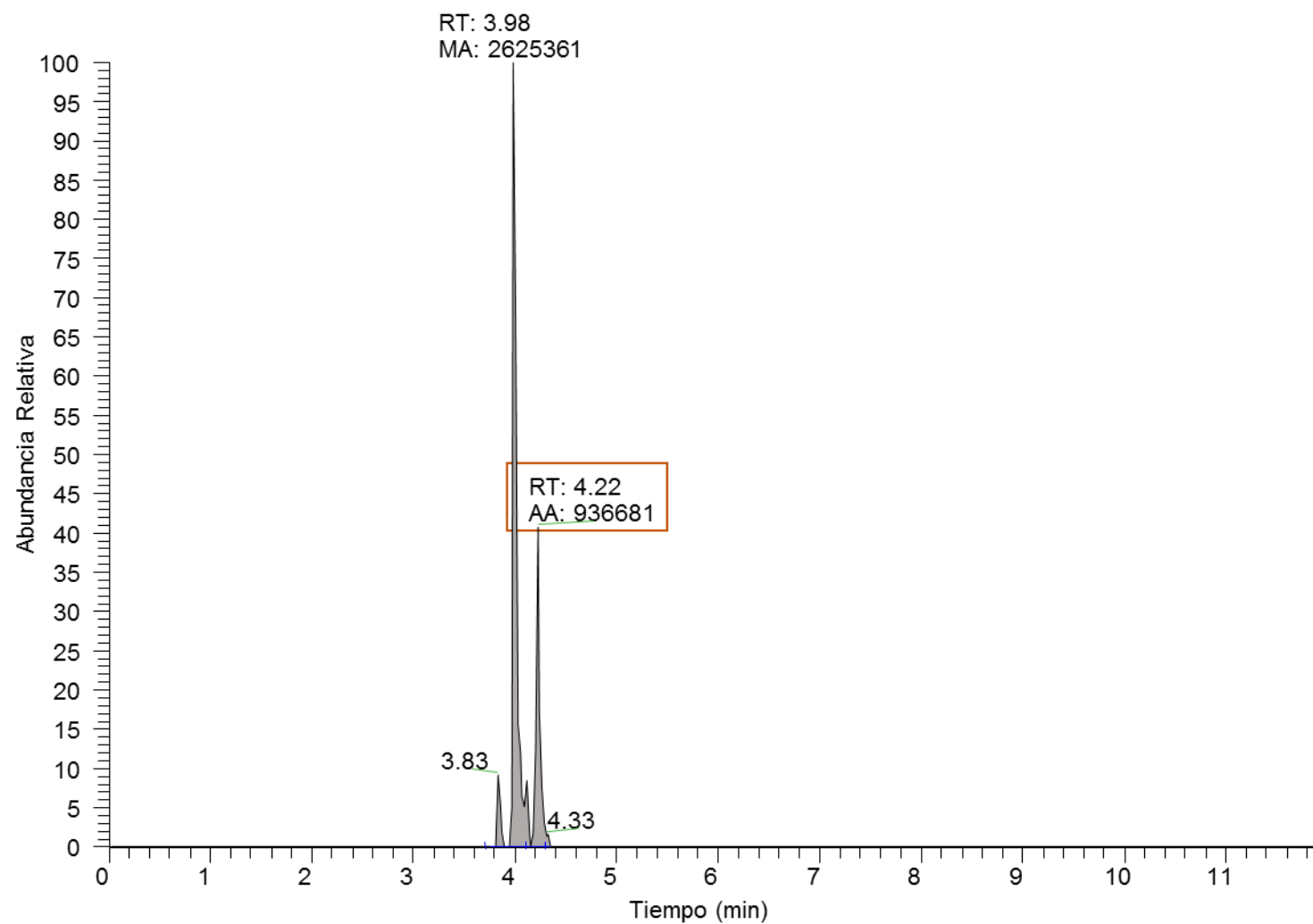


Figura 25. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 465.10268) de la isoquercetina ($C_{21}H_{20}O_{12}$), $t_R = 4.22$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS.

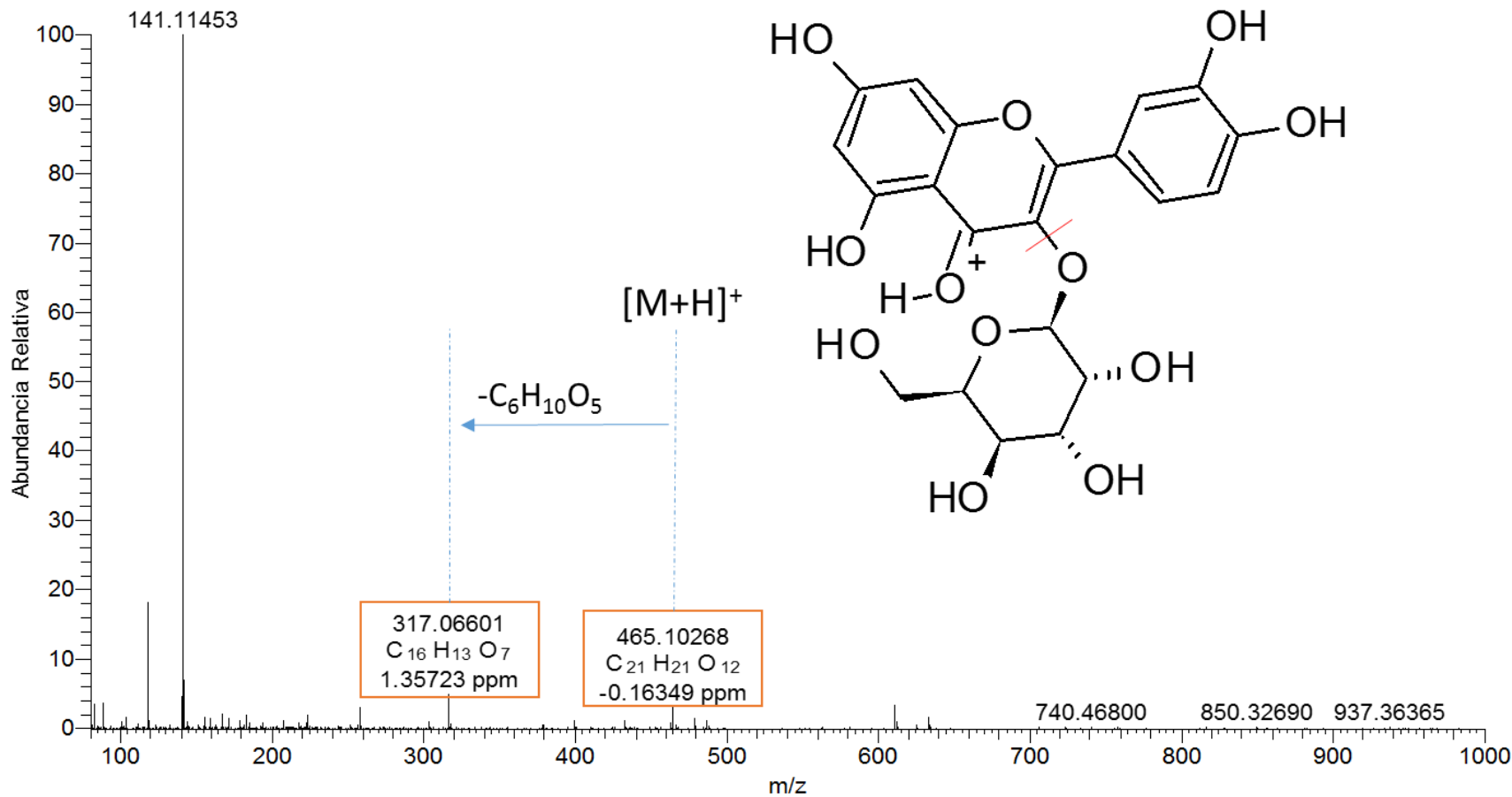


Figura 26. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, de la isoquercetina (C₂₁H₂₀O₁₂), t_R = 4.22 min, adquirido en modo *full scan*.

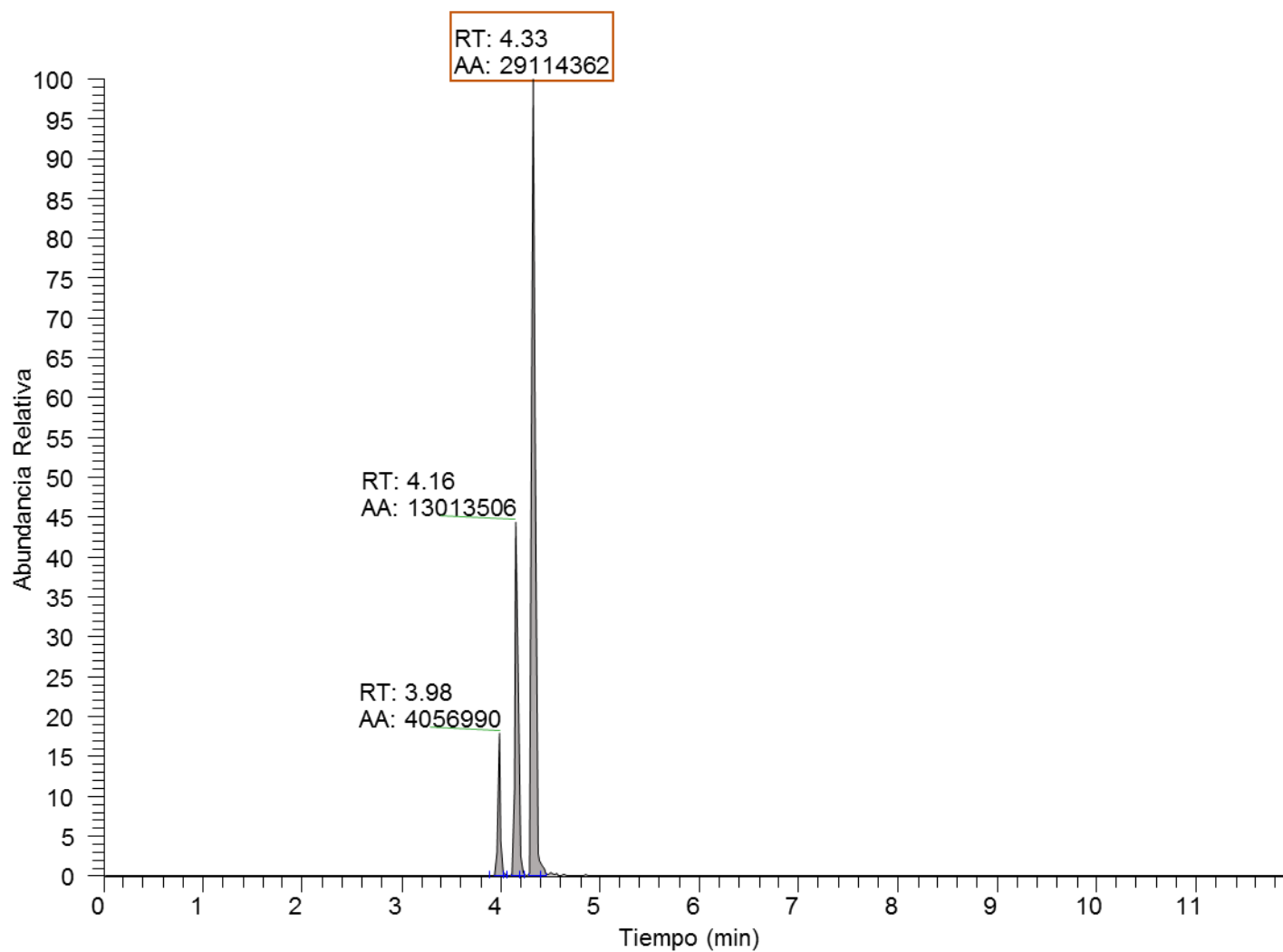


Figura 27. Corriente iónica extraída (EIC), adquirida en modo *full scan* correspondiente a la molécula protonada MH^+ (m/z 625.17712) de la narcisina ($C_{28}H_{32}O_{16}$), $t_R = 4.33$ min. LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS.

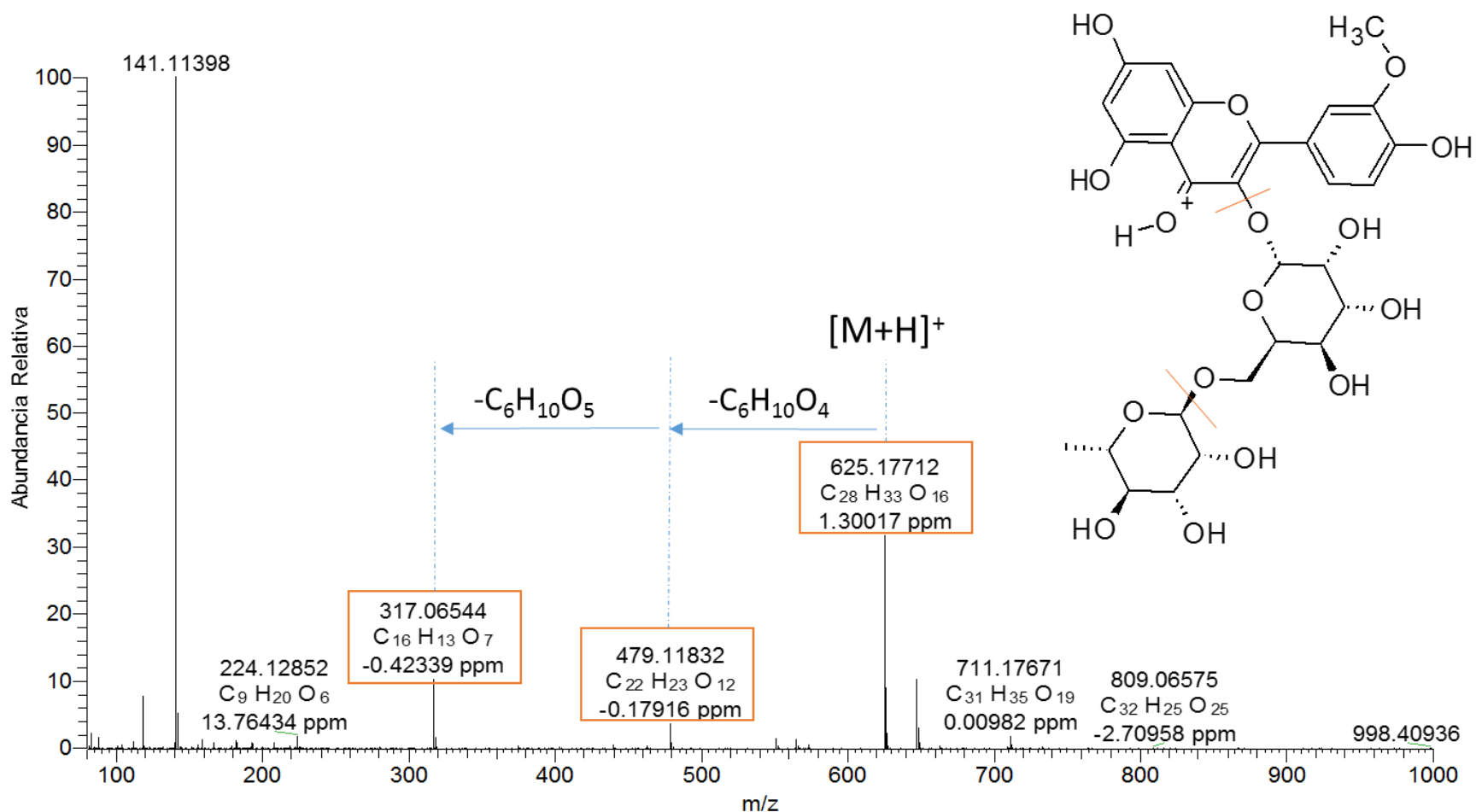


Figura 28. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, de la narcisina (C₂₈H₃₂O₁₆), t_R = 4.33 min, adquirido en modo *full scan*.

6.3. Análisis por LC-Orbitrap-MS del extracto MSPD del fitofármaco.

La identificación de los compuestos presentes en el extracto MSPD del fitofármaco se realizó empleando los parámetros descritos en la **Sección 3.6.2**, operando la interfaz HESI-II para la adquisición de iones positivos. La cuantificación se realizó empleando quercitrina, en una concentración de 0,5 ppm, como estándar interno (*istd*). En la **Tabla 8** aparece la identificación de los compuestos encontrados en el fitofármaco y su cuantificación se presenta en microgramos de compuesto por gramo de fitofármaco. El compuesto diclofenaco, también se encontró empleando este método y su cuantificación se llevó a cabo, según descrito en la **Sección 4.4**.

En esta **Tabla 8** se aprecia que la isoquercetina fue el compuesto mayoritario, seguido de la narcisina. Esto difiere de la composición presentada en la **Tabla 7** para los metabolitos secundarios aislados de la planta de caléndula. Por otro lado, en el fitofármaco no se detectaron mangaslina y rutina, compuestos que si están presentes en la caléndula. También, se observa que de lote a lote la concentración de metabolitos secundarios identificados varía de tal forma que en algunos lotes no se lograba detectar algunos metabolitos, *e.g.*, narcisina o tifaneósido. La diferencia de concentración entre los compuestos identificados en la caléndula y el fitofármaco puede atribuirse a la variación en la composición entre plantas o entre partes de la misma especie. También, se debe tener en cuenta, que en el empaque del fitofármaco aparece que éste está hecho con “250 mg *C. officinalis*” y, efectivamente, en las grageas se observan pedazos de lo que podría ser una planta molida (Véase **Anexo 1**).

Los diferentes lotes del fitofármaco tuvieron diferencias en la cantidad de metabolitos detectados, todos inferiores al corredor de error. Un punto importante a resaltar es que la

presencia de estos compuestos en los diferentes lotes del fitofármaco sugiere que este posee extracto vegetal o partes molidas de la planta (posiblemente, caléndula). La **Figura 29** muestra la comparación de las corrientes iónicas extraídas de los compuestos identificados en el extracto MSPD de la caléndula y el extracto MSPD del fitofármaco. en ésta se aprecia de forma gráfica la variación de la concentración de los metabolitos secundarios identificados en la plata de caléndula y el fitofármaco, y el diclofenaco; la escala de **A** está ajustada a $4,5 \times 10^6$, mientras que la escala de **B**, está ajustada a 8×10^3 ; el diclofenaco está escalado a 3×10^6 .

En las **Figuras 30, 31 y 32** se puede observar la comparación de las corrientes iónicas extraídas, de los compuestos identificados, con sus tiempos de retención, en los extractos obtenidos del fitofármaco (diferentes lotes) y de la caléndula. La **Figura 33** muestra la comparación de las corrientes iónicas del patrón certificado de diclofenaco y los extractos obtenidos de los diferentes lotes del fitofármaco.

Tabla 8. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto MSPD del fitofármaco.

Compuesto	<i>M/z</i> [M+H] ⁺		Lote F333		Lote F460		Lote F463		Lote F500	
	Calc.	Exp.	Δ ppm	Concentración, $\mu\text{g/g}$	Δ ppm	Concentración, $\mu\text{g/g}$	Δ ppm	Concentración, $\mu\text{g/g}$	Δ ppm	Concentración, $\mu\text{g/g}$
Tifaneósido	771,23422	771,23431	-1.46081	50 \pm 19	-1.0021	67 \pm 7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Calendoflavósido	625,17631	625,17603	-1,81168	37 \pm 1	-0,45715	53 \pm 9	0,03099	55 \pm 9	-1,53107	66 \pm 9
Isoquercetina	465,10275	465,10281	0,85475	420 \pm 35	0,45802	330 \pm 21	0,6567	300 \pm 35	0,32862	320 \pm 10
Narcisina	625,17631	625,17578	-0,35952	160 \pm 58	N.D.	N.D.	-1,43344	280 \pm 53	-2,01921	86 \pm 9

N.D.: no detectado.

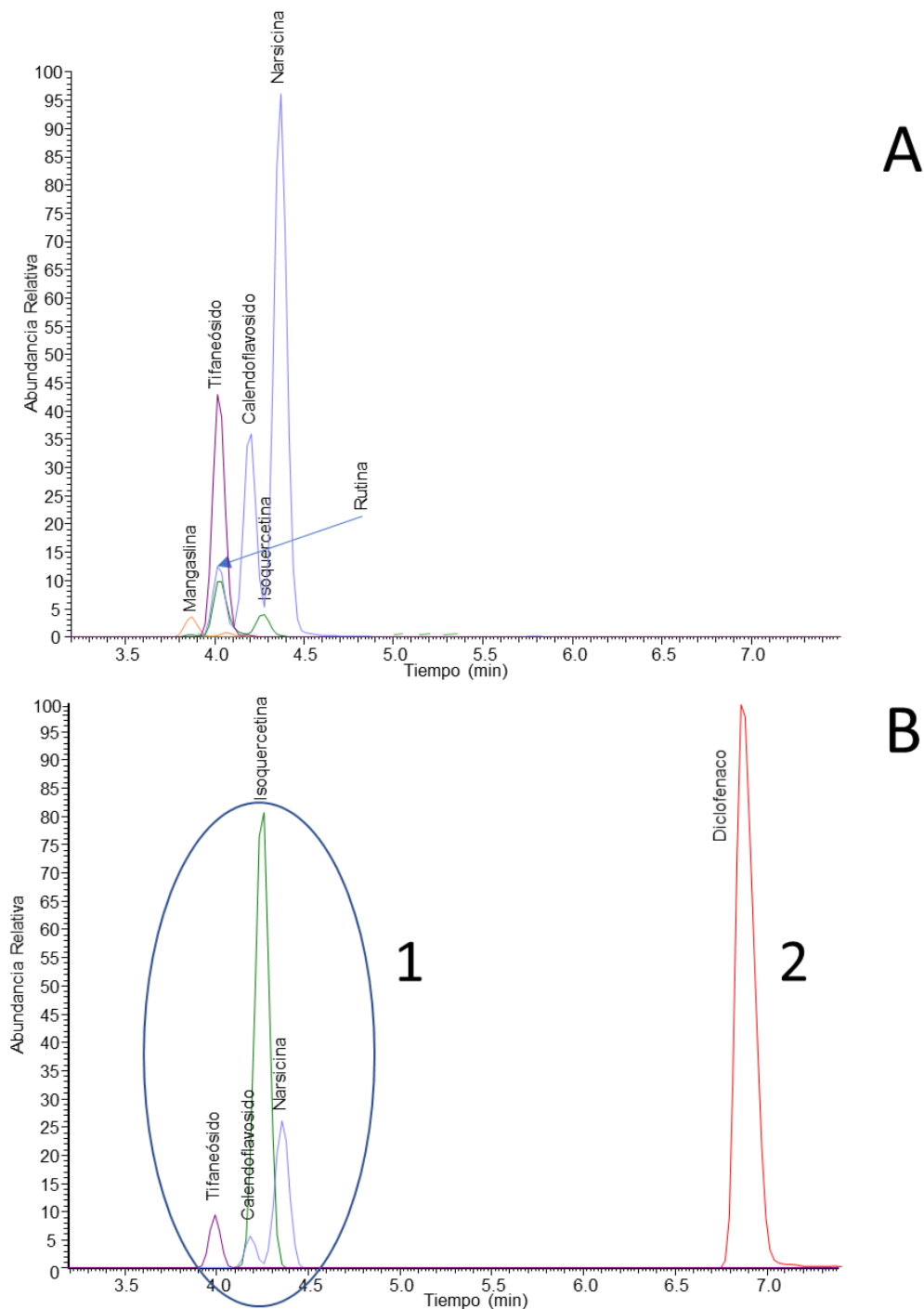


Figura 29. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC), correspondientes a las moléculas protonadas $[M+H]^+$ de los compuestos identificados en: A. El extracto MSPD de la caléndula (escala absoluta $4,5 \times 10^6$) y B. El extracto MSPD del fitofármaco (1. Escala absoluta 8×10^3 y 2. Escala absoluta de diclofenaco 3×10^6).

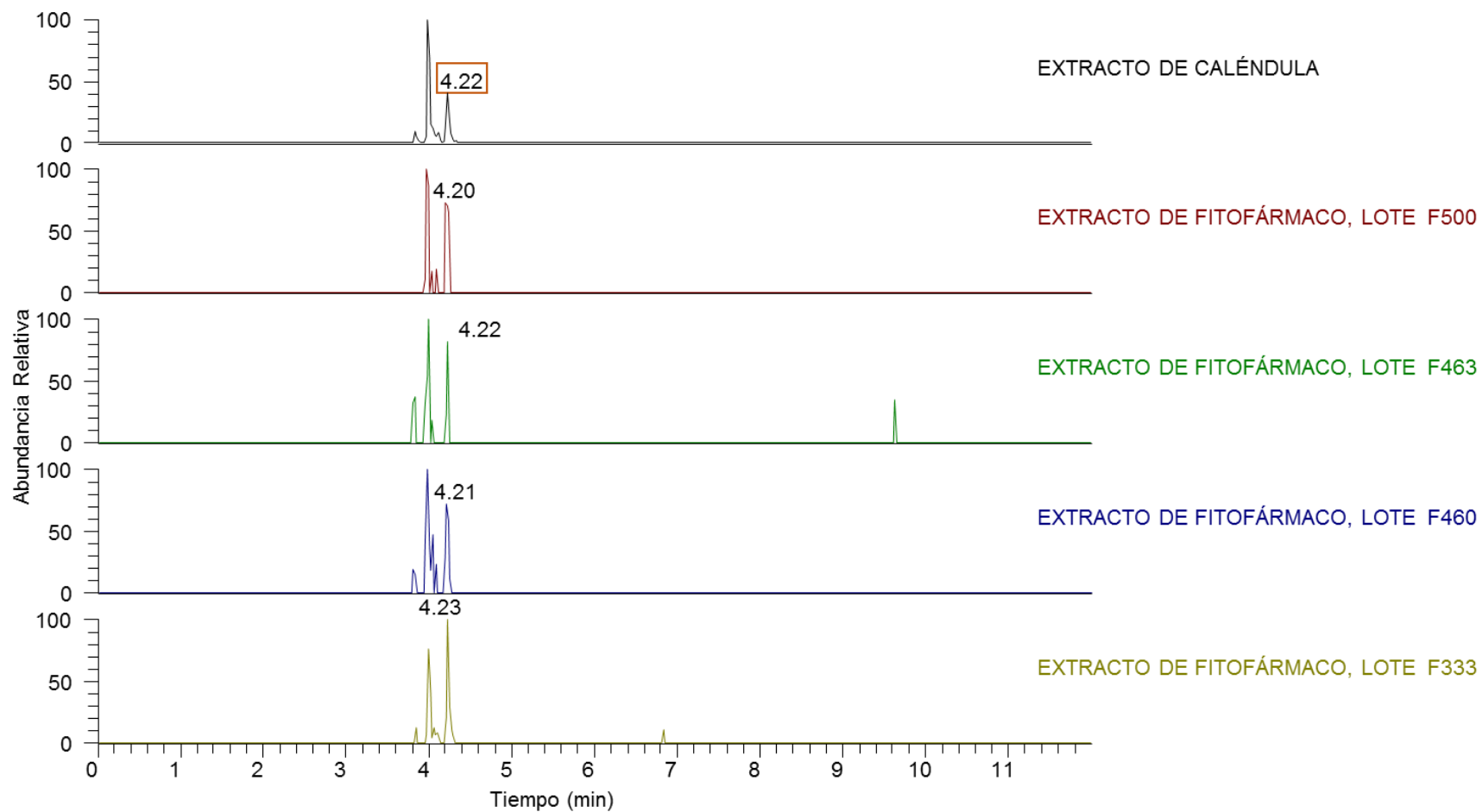


Figura 30. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC), correspondientes a la molécula protonada MH^+ (m/z 465.10268) de la isoquercetina ($t_R = 4.22$ min) ($C_{21}H_{20}O_{12}$). LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS. Modo de adquisición *full scan*.

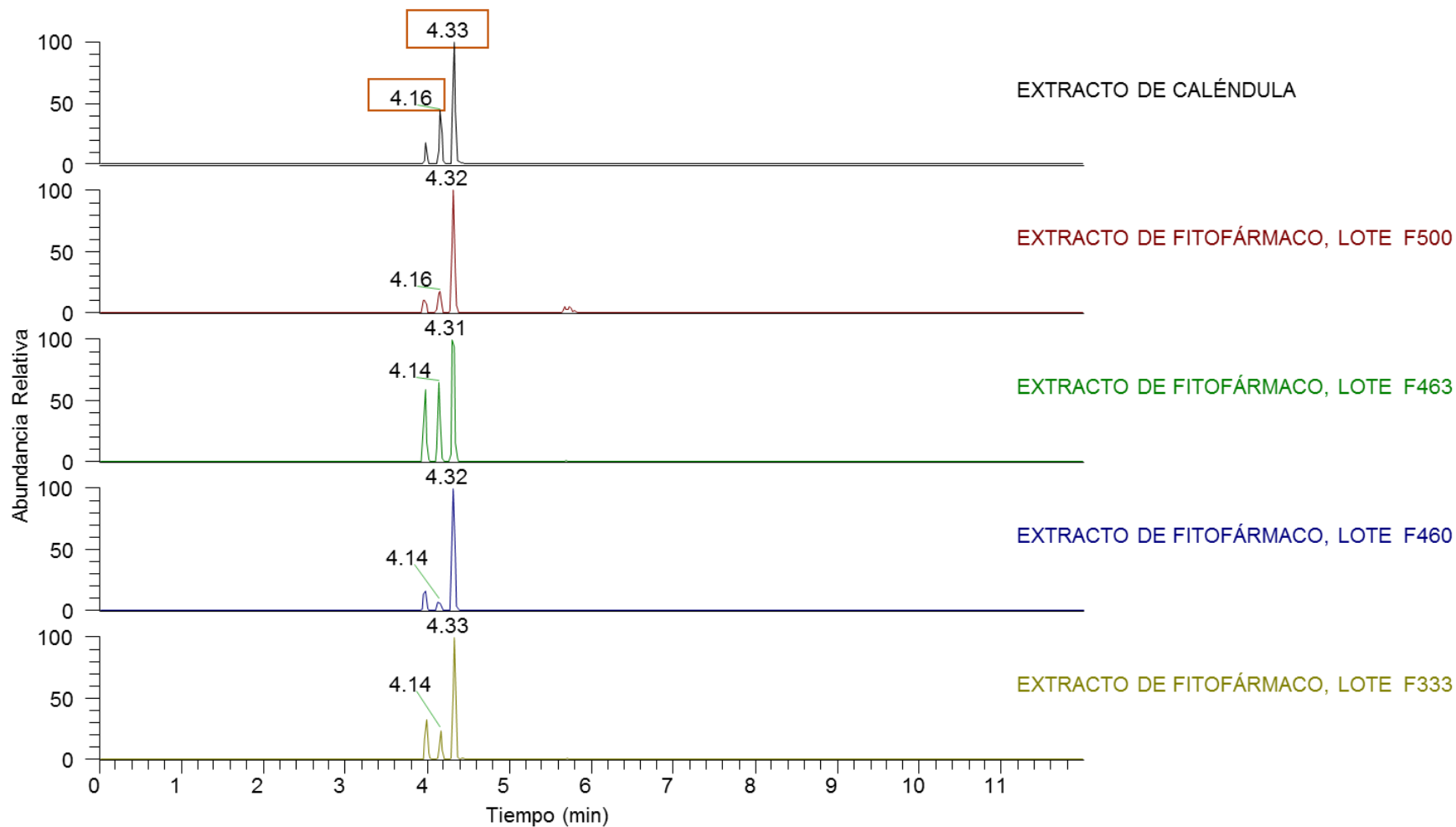


Figura 31. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a la molécula protonada MH^+ (m/z 625.17747) del calendoflavósido ($t_R = 4.16$ min) ($C_{28}H_{32}O_{16}$) y la narcissina ($t_R = 4.33$ min) ($C_{28}H_{32}O_{16}$), LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS. Modo de adquisición *full scan*.

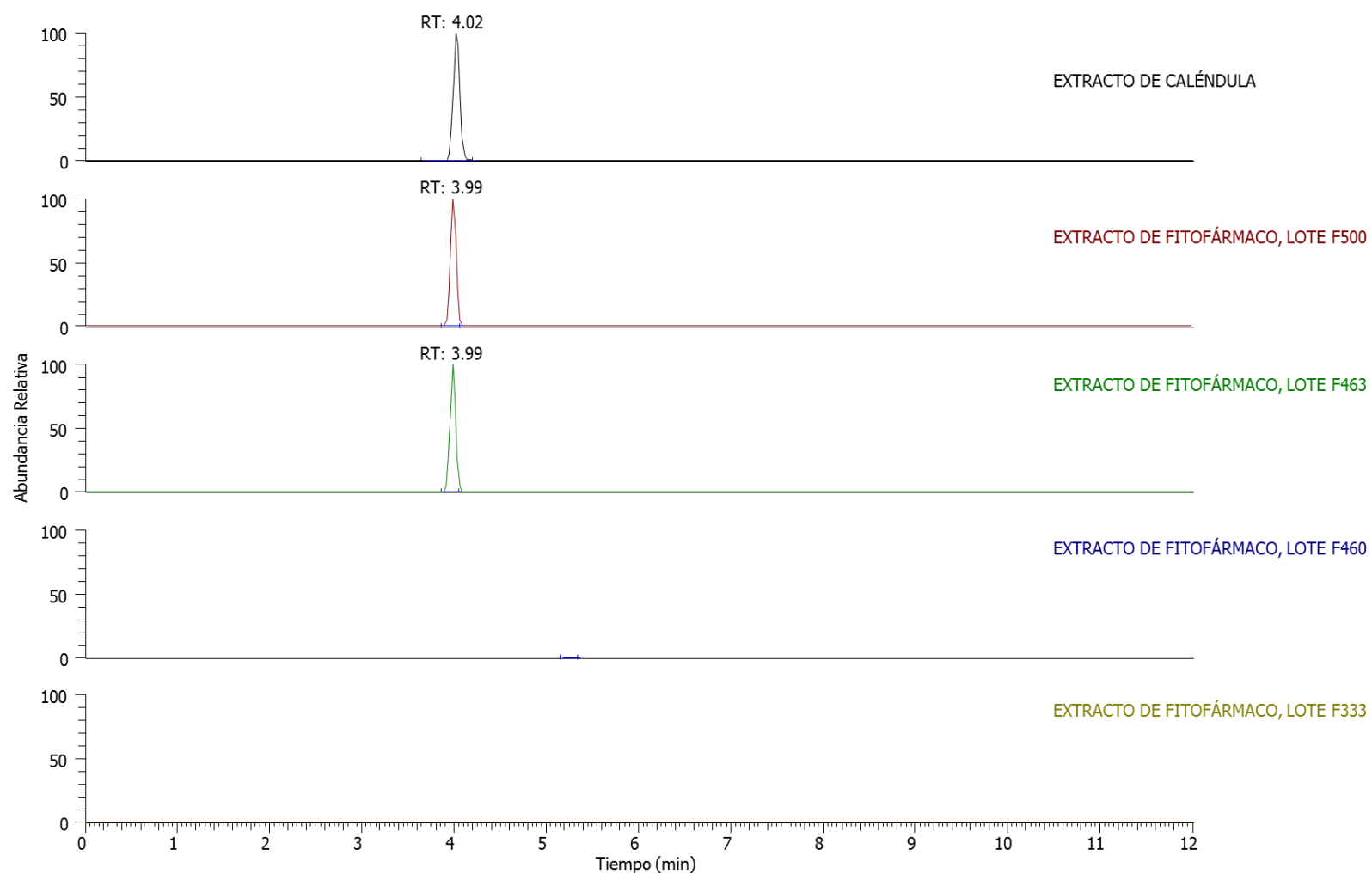


Figura 32. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a la molécula protonada MH^+ (m/z 771.23431) del tiffaneósido ($C_{34}H_{42}O_{20}$), LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS. Modo de adquisición *full scan*.

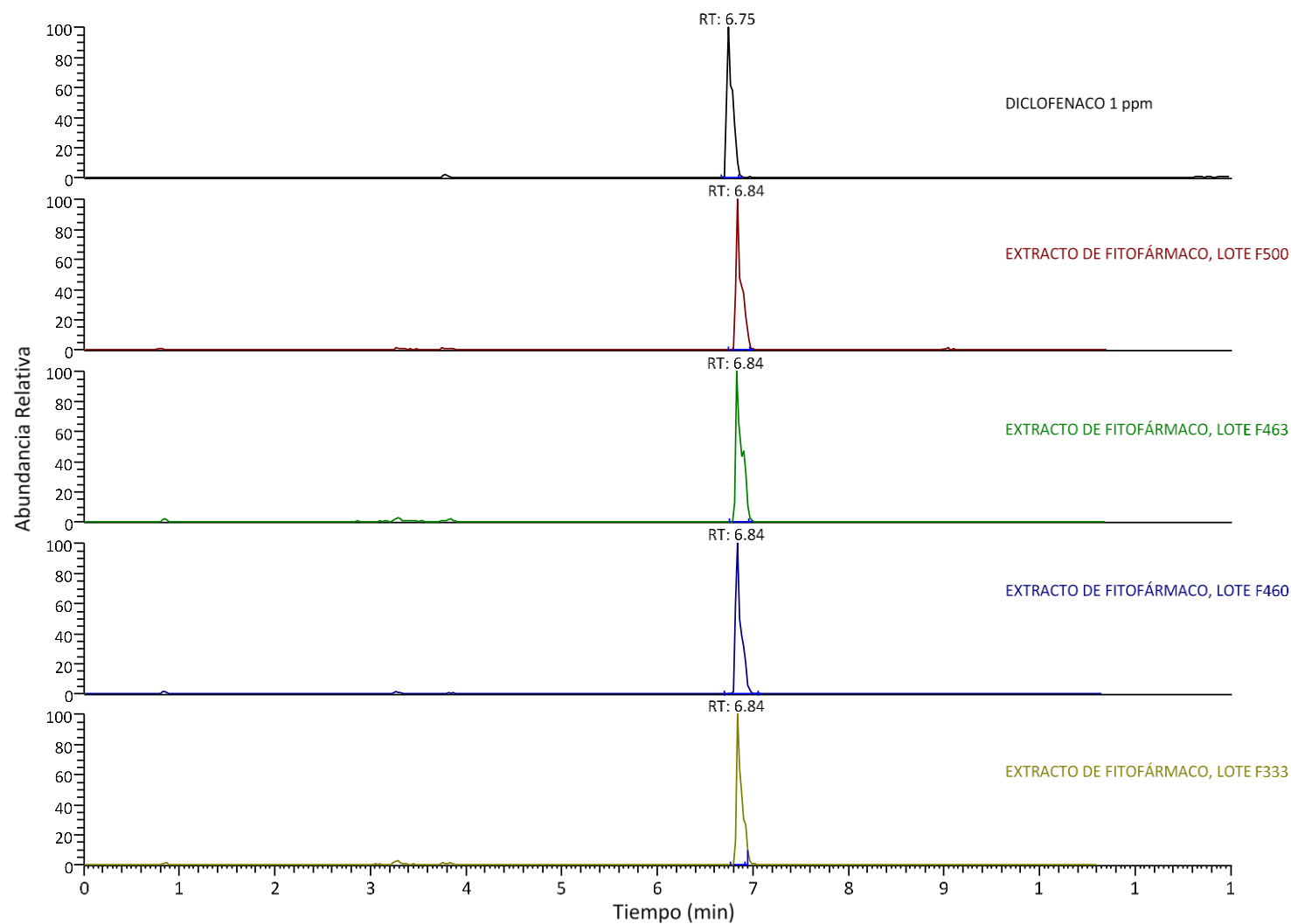


Figura 33. Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC) correspondientes a la molécula protonada MH^+ (m/z 296,02396) del diclofenaco ($t_R = 6.82 \pm 0,03$ min) ($C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$). LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS. Modo de adquisición *full scan*.

6.4. Análisis cuantitativo del diclofenaco por GC-MS-SIM y UHPLC-ESI-Orbitrap-MS.

La preparación de las curvas de calibración del diclofenaco se llevó a cabo, según lo enunciado en la **Sección 3.5**. Para la cuantificación del diclofenaco por cromatografía de gases (GC-MS) se operó el espectrómetro de masas en modo de monitoreo de iones seleccionados (*SIM*), empleando los fragmentos característicos en m/z 214, 242 y 277 (Véase **Figura 14**), similar a lo reportado por Shah, *et al.* (2016) [51]. La cuantificación del diclofenaco presente en el fitofármaco por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS se realizó usando los parámetros descritos en la **Sección 3.6.2**, operando la interfaz HESI-II para la adquisición de iones negativos. La identificación confirmatoria del diclofenaco se realizó empleando su patrón certificado (*Sigma-Aldrich*). La **Tabla 9** muestra algunos parámetros de la curva de calibración determinada para el diclofenaco y los niveles mínimos de cuantificación (Véase **Anexo 3**). En la **Tabla 10** se presentan los resultados de la cuantificación del diclofenaco en el fitofármaco estudiado. La cantidad del diclofenaco por pastilla fue alrededor del 10%. Es un hecho que es alarmante, debido a que dentro de los componentes reportados en el empaque y ante el ente regulador (INVIMA), no se hace ninguna mención a la presencia de este compuesto. A esto se le suma el riesgo que representa el diclofenaco para aquellas personas que no lo pueden usar debido a los efectos secundarios que posee este antiinflamatorio, sobre todo, para personas con problemas cardiovasculares [59].

Tabla 9. Curvas de calibración y niveles mínimos de cuantificación (NMC) del diclofenaco determinadas mediante GC-MS-SIM y UHPLC-ESI-*Orbitrap*-MS.

Técnica analítica	Rango	Y=mx +b	R²	NMC
GC-MS-SIM	10-400 µg/mL	Y= 41984x - 12909	0.9969	0.2 (mg/mL)
UHPLC-ESI ⁽⁻⁾ - <i>Orbitrap</i> -MS	1-500 µg/L	Y= 28111x - 135072	0.9991	2.5 (µg/L)

Tabla 10. Concentración del diclofenaco en pastillas del fitofármaco de diferentes lotes, determinada mediante GC-MS-SIM y UHPLC-ESI-Orbitrap-MS.

Código interno	Descripción de la muestra	Técnica instrumental			
		GC-MS-SIM		LC-MS	
		g/kg	% (p/p)	g/kg	% (p/p)
M1_Lote F500	Muestra 1, “Fitofármaco, <i>Calendula officinalis</i> , Lote: F500	90 ± 21	9 ± 2	108 ± 6	10.8 ± 0.6
M3_Lote F463	Muestra 3, “Fitofármaco, <i>Calendula officinalis</i> , Lote: F463	100 ± 3	10,0 ± 0,3	106 ± 6	10.6 ± 0.6
M5_Lote F460	Muestra 5, “Fitofármaco, <i>Calendula officinalis</i> , Lote: F460	84 ± 2	8,4 ± 0,2	99 ± 2	9.9 ± 0.2
M8_Lote F333	Muestra 8, “Fitofármaco, <i>Calendula officinalis</i> , Lote: F333,	80 ± 18	8 ± 2	93 ± 6	9.3 ± 0.6

7. Conclusiones.

Empleando la técnica instrumental GC-MS, en el extracto etanólico de la caléndula se identificaron 15 compuestos y en el extracto etanólico del fitofármaco, seis compuestos. Sin embargo, los compuestos identificados en el fitofármaco no concuerdan con la composición química determinada por GC-MS para el extracto obtenido de la planta.

Se identificaron por UHPLC-*Orbitrap*-MS, en el extracto del fitofármaco los compuestos narcisina, tifaneósido, calendoflavósido, entre otros, en concentraciones menores y en proporciones diferentes a las encontradas en el extracto de la planta, reportados también en literatura científica para *Calendula officinalis*.

Se analizaron diferentes lotes de producción del fitofármaco y en todos se encontró la presencia de diclofenaco como adulterante.

La cantidad del diclofenaco encontrado en el fitofármaco, fue cercana al 10% p/p. Una persona que consuma una pastilla de este fitofármaco comercial ingiere ≈ 59 mg de diclofenaco, por cada toma; se suelen prescribir tres pastillas diarias ($\approx 170 - 200$ mg). La dosis máxima diaria permitida ($\approx 100 - 150$ mg); lo que puede presentar peligro para aquellas personas que tienen problemas cardiacos o gastrointestinales.

Tetracaína, estrona, codeína, procaína y cortisona, no fueron encontrados en los resultados obtenidos por GC-MS y LC- MS, en las pastillas analizadas, y sí son reportados por el Laboratorio de Rayos X – UIS.

8. Recomendaciones.

Revisar los resultados obtenidos por el laboratorio de Rayos X de la UIS.

Estudiar algunos otros fitofármacos con propiedades antiinflamatorias, para verificar su composición y comprobar que su principio activo si es de origen natural.

Enviar a INVIMA los resultados de estudio del fitofármaco analizado.

Referencias

- [1] Buchbauer, G. (2000). The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Perfumer Flavorist*, 25, 64-87.
- [2] Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jáger, W., Plank, C., & Dietrich, H. (1993). Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82 (6), 660-664.
- [3] Cañigüeral, S., & Vila, R. (2001). Principios de la Fitoterapia. *Plantas medicinales y Fitoterapia, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, 1*, 173-193.
- [4] Aneesh, T. P., Hisham, M., Sekhar, S., Madhu, M., & Deepa, T. V. (2009). International market scenario of traditional Indian herbal drugs – India declining. *International Journal of Green Pharmacy*, 3 (3), 184-190.
- [5] WHO, W. (2013). WHO Traditional Medicine Strategy 2014–2023. *World Health Organization*, http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/, consultado el 25 de octubre de 2018.
- [6] Hatanaka, H. and Hashimoto, K. (1984). Addition of synthetic medicines in herbal medicines: Hyogo Prefect. *Public Health Institute Bulletin*, 19, 106-108.
- [7] Bowron, P., & Lewis, J. H. (1987). Possible contamination of a herbal product with a prohibited substance. *The Medical Journal of Australia*, 146 (6), 325-325.
- [8] Huang, W. F., Wen, K. C., & Hsiao, M. L. (1997). Adulteration by synthetic therapeutic substances of traditional Chinese medicines in Taiwan. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 37 (4), 344-350.

- [9] Van der Stricht, B. I., Parvais, O. E., Vanhaelen-Fastre, R. J., Vanhaelen, M. H., & Quertinier, D. (1994). Safer use of traditional remedies. Remedies may contain cocktail of active drugs. *British Medical Journal*, 308 (6937), 1162-11662.
- [10] Liu, S. Y., Woo, S. O., Holmes, M. J., & Koh, H. L. (2000). LC and LC-MS-MS analyses of undeclared codeine in antiasthmatic Chinese proprietary medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22 (3), 481-486.
- [11] Blok-Tip, L., Zomer, B., Bakker, F., Hartog, K. D., Hamzink, M., Ten Hove, J., & de Kaste, D. (2004). Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products. *Food Additives and Contaminants*, 21 (8), 737-748.
- [12] Liang, Q., Qu, J., Luo, G., & Wang, Y. (2006). Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40 (2), 305-311.
- [13] Bogusz, M. J., Hassan, H., Al-Enazi, E., Ibrahim, Z., & Al-Tufail, M. (2006). Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2), 554-564.
- [14] Calahan, J., Howard, D., Almalki, A. J., Gupta, M. P., & Calderón, A. I. (2016). Chemical adulterants in herbal medicinal products: a review. *Planta Medica*, 82 (06), 505-515.
- [15] World Health Organization. (1999). *WHO. Monographs on selected medicinal plants* (Vol. 2). World Health Organization.
- [16] Muley, B. P., Khadabadi, S. S., & Banarase, N. B. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* (Asteraceae): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (5).

- [17] Mullaicharam, A. R., Amaresh, N., & Balasubramanian, H. (2014). Phytochemistry and pleiotropic pharmacological properties of *Calendula officinalis* - a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2 (4), 1-10.
- [18] Khare, C. P. (2008). *Indian medicinal plants: an illustrated dictionary*. Springer Science & Business Media, Verlag, Berlin, Alemania, 111-112.
- [19] Hamburger, M., Adler, S., Baumann, D., Förg, A., & Weinreich, B. (2003). Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, 74 (4), 328-338.
- [20] Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., & Kimura, Y. (2006). Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of Natural Products*, 69 (12), 1692-1696.
- [21] Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- [22] Decreto número 2266, Ministerio de la Protección Social, Bogotá, Colombia 15 de julio de 2004.
- [23] Panusa, A., Multari, G., Incarnato, G., & Gagliardi, L. (2007). High-performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (4), 1221-1227.
- [24] Savaliya, A. A., Shah, R. P., Prasad, B., & Singh, S. (2010). Screening of Indian aphrodisiac ayurvedic/herbal healthcare products for adulteration with sildenafil, tadalafil and/or vardenafil

using LC/PDA and extracted ion LC–MS/TOF. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (3), 406-409.

[25] Moreira, A. P. L., Motta, M. J., Dal Molin, T. R., Viana, C., & de Carvalho, L. M. (2013). Determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal formulations for weight loss. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (7), 1230-1237.

[26] Barker, S. A. (2000). Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885 (1-2), 115-127.

[27] Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbio, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217 (16), 2521-2532.

[28] de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Udo, A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112 (1-2), 31-63.

[29] Mitra, S. (Ed.). (2004). *Sample preparation techniques in analytical chemistry* (Vol. 237). John Wiley & Sons, New Jersey, United States, 155-156.

[30] Luque-Garcia, J. L., & de Castro, M. L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 22 (1), 41-47.

[31] Bussemas, H. H., Harsch, G., & Ettre, L. S. (1994). Friedlieb Ferdinand Runge (1794–1867): “self-grown pictures” as precursors of paper chromatography. *Chromatographia*, 38 (3-4), 243-254.

[32] Robinson, T. (1960). Michael Tswett. University of California Press, California, EE.UU. 6 (1960), 146-161

- [33] Bartle, K. D., & Myers, P. (2002). History of gas chromatography. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 21 (9-10), 547-557.
- [34] Hunter, G. L. K., & Parks, G. L. (1964). Isolation of beta-Elemene from Orange Oil. *Journal of Food Science*, 29 (1), 25-26.
- [35] Nollet, L. M., & Toldrá, F. (Eds.), (2012), *Food analysis by HPLC.*, Florida EE.UU., CRC Press, 3rd edition, 726-738.
- [36] Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72 (6), 1156-1162.
- [37] Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., & Graham Cooks, R. (2005). The *Orbitrap*: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (4), 430-443.
- [38] Bakó, E., Deli, J., & Tóth, G. (2002). HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53 (1-3), 241-250.
- [39] Lone, P. A., Bhardwaj, A. K., & Bahar, F. A. (2015). Study of indigenous/traditional medicinal plant knowledge-An endeavour towards new drug discovery. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12 (2), 73-95.
- [40] Martins, F. S., da Conceição, E. C., Bandeira, E. S., & Silva, J. O. C. (2014). The effects of extraction method on recovery rutin from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Pharmacognosy Magazine*, 10 (Suppl 3), S569.
- [41] Mishra, A. K., Mishra, A., & Chattopadhyay, P. (2018). Screening of acute and sub-chronic dermal toxicity of *Calendula officinalis* L essential oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98, 184-189.

- [42] Nicolaus, C., Junghanns, S., Hartmann, A., Murillo, R., Ganzera, M., & Merfort, I. (2017). *In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 94-103.
- [43] Salehi, B., Kumar, N. V. A., Şener, B., Sharifi-Rad, M., Kılıç, M., Mahady, G. B., & Ayatollahi, S. A. (2018). Medicinal Plants Used in the Treatment of Human Immunodeficiency Virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (5), 1459.
- [44] Ku, Y. R., Tsai, M. J., & Wen, K. C. (1995). Screening chemical drugs used to adulterate in rheumatic and analgesic traditional Chinese medicine by HPLC-DAD. *Journal of Food and Drug Analysis*, 3 (1), 51-56.
- [45] Ching, C. K., Chen, S. P. L., Lee, H. H. C., Lam, Y. H., Ng, S. W., Chen, M. L., & Chan, T. Y. C. (2018). Adulteration of proprietary Chinese medicines and health products with undeclared drugs: experience of a tertiary toxicology laboratory in Hong Kong. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84 (1), 172-178.
- [46] Organización Mundial de la Salud (2005) Métodos de control de calidad para materiales de plantas medicinales. OMS, Ginebra. <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s7918e/s7918e.pdf> consultado el 02 de agosto de 2018.
- [47] Bandaranayake, W. M. (2006). Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs. En I. Ahmad, F. Aquil, M. Owais (Ed), *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants Into Drugs*, 25-57. Wiley-VCH
- [48] Global Industry Analysts Inc. (2013). Herbal Supplements and Remedies—A Global Strategic Business Report.
- [49] Revista Dinero, <https://www.dinero.com/edicion-impres/negocios/articulo/sector-farmaceutico-aumenta-inversiones-en-colombia/252649>. Consultado el 20 de agosto de 2018.

- [50] Xiao, H. B., Krucker, M., Albert, K., & Liang, X. M. (2004). Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1032 (1-2), 117-124.
- [51] Shah, I., Barker, J., Naughton, D. P., Barton, S. J., & Ashraf, S. S. (2016). Determination of diclofenac concentrations in human plasma using a sensitive gas chromatography mass spectrometry method. *Chemistry Central Journal*, 10 (1), 52.
- [52] Adams, R. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry* (Vol. 456). Carol Stream, USA. Allured Publishing Corporation.
- [53] Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40 (4), 043101.
- [54] Bisogno, T., Sepe, N., De Petrocellis, L., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (1997). The sleep inducing factor oleamide is produced by mouse neuroblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239 (2), 473-479.
- [55] Lambert, D. M., & Di, V. M. (1999). The palmitoyl ethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Current Medicinal Chemistry*, 6 (8), 757-773.
- [56] Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Jalinskaitė, M., & Maruška, A. (2011). Chemical composition and chemometric analysis of variation in essential oils of *Calendula officinalis* L. during vegetation stages. *Chromatographia*, 73 (1), 163-169.
- [57] Giordano, F., Rossi, A., Pasquali, I., Bettini, R., Frigo, E., Gazzaniga, A., & Catinella, S. (2003). Thermal degradation and melting point determination of diclofenac. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 73 (2), 509-518.

[58] Kosjek, T., Heath, E., & Kompare, B. (2007). Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (4), 1379-1387.

[59] Gislason, G. H., Rasmussen, J. N., Abildstrom, S. Z., Schramm, T. K., Hansen, M. L., Fosbøl, E. L., & Rasmussen, S. (2009). Increased mortality and cardiovascular morbidity associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic heart failure. *Archives of Internal Medicine*, 169 (2), 141-149.