

Trabajo Fin de Grado

Separación y cuantificación del ácido rosmarínico en plantas medicinales

Idaira Sánchez Darias



Curso 2017-2018



María Jesús Sánchez Sánchez y Guillermo González Hernández, Profesora y Profesor Titular de Química Analítica, y miembros del citado departamento de la Universidad de La Laguna,

INFORMAN:

Que **D^a Idaira Sánchez Darias**, alumna de Química de la Universidad de La Laguna, ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo de Fin de Grado en Química con el título "**Separación y cuantificación de ácido rosmarínico en plantas medicinales**".

Revisado el citado trabajo, autorizamos su presentación para que proceda a su lectura y defensa pública, para optar al Grado en Química por esta Universidad.

Y para que así conste, firmamos el presente en San Cristóbal de La Laguna a seis de junio de dos mil dieciocho.

Fdo: María Jesús Sánchez Sánchez

Fdo: Guillermo González Hernández

Resumen

El ácido rosmarínico es un ácido polifenólico bioactivo natural presente en numerosas especies vegetales, destacando, por su alto contenido, en plantas como la melisa (*Melissa officinalis*) y el romero (*Rosmarinus officinalis*). De igual forma, también se encuentra en cantidades significativas en la salvia (*Salvia officinalis*), la menta (*Mentha piperita*) y el orégano (*Origanum vulgare*), fundamentalmente.

Las plantas mencionadas se utilizan como condimento alimentario o se ingieren en infusiones por la actividad antioxidante de este compuesto. Asimismo, debido a su actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral y antimutagénica, el ácido rosmarínico suscita especial interés en la industria farmacológica y cosmética.

En este trabajo se estudia y se adecua el procedimiento para extraer y cuantificar el ácido rosmarínico por lixiviación, seguido de una extracción en fase sólida, y separado y cuantificado mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia con detección por absorción molecular. Además, se demuestra la aplicabilidad de la metodología propuesta en muestras de plantas medicinales.

Abstract

Rosmarinic acid is a natural bioactive polyphenolic acid present in numerous plant species, specially in plants such as lemon balm (*Melissa officinalis*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) due to its high content. Likewise, it is also found in significant amount in sage, (*Sage officinalis*), mint (*Mentha piperita*) and the oregano (*Origanum vulgare*), mainly.

The plants mentioned above are used as a food-flavoring agent or are consumed in infusions because of the antioxidant activity of this compound. Also, due to its anti-inflammatory, antibacterial, antiviral and antimutagenic activity, rosmarinic acid is of interest to the pharmaceutical and cosmetic industry.

In this paper, the procedure for extracting and quantifying rosmarinic acid is studied and adapted. Rosmarinic acid is extracted by leaching followed by solid phase extraction and separated and quantified by high efficiency liquid chromatography with molecular absorption detection. In addition, the applicability of the methodology proposed to samples of medicinal plants is demonstrated.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia.....	2
1.2 Extracción sólido-líquido	4
1.3 Extracción en fase sólida.....	6
2. Objetivos del trabajo.....	10
3. Parte experimental	11
3.1 Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones.....	11
3.2 Materiales	11
3.3 Equipos.....	12
3.3.1 Instrumentos	12
3.3.2 Aparatos	12
3.3.3 Programas informáticos.....	13
3.4. Muestras	13
3.5. Procedimientos experimentales.....	13
4. Resultados y discusión	15
4.1 Características del ácido rosmarínico.....	15
4.2 Estudio de estabilidad del ácido rosmarínico	16
4.3 Separación cromatográfica.....	17
4.4 Estudio de repetibilidad y calibrado.....	24
4.5 Optimización del tiempo de extracción de la lixiviación	27
4.6 Estudio de recuperación de SPE.....	28
4.7 Límites de detección y cuantificación del método	29
4.8 Cuantificación de ácido rosmarínico en las muestras de plantas medicinales	29
4.9 Perspectivas de trabajo futuras.....	32
5. Conclusiones.....	33
6. Glosario	34
7. Referencias	35

1. Introducción

El ácido rosmarínico es un ácido polifenólico bioactivo natural presente en varias especies de plantas, especialmente de las familias *Lamiaceae* y *Boraginaceae*. Entre éstas cabe destacar el romero (*Rosmarinus officinalis*), la salvia (*Salvia officinalis*), la menta (*Mentha piperita*) y la melisa (*Melissa officinalis*) (Ondrejovic *et al.*, 2012).

A lo largo de la historia, estas plantas han sido usadas como condimento alimentario y como remedios caseros para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades y trastornos, tales como el cansancio, la debilidad o la depresión. De igual forma, se han empleado para tratar los problemas de circulación y prevenir la pérdida de memoria. En la actualidad, los extractos de estas plantas aromáticas se usan en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Numerosos estudios han descubierto que estas plantas cuentan con compuestos con alta actividad antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica y antidepresiva. Estas propiedades se deben al alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente el ácido rosmarínico (Wang *et al.*, 2004; Bellumori *et al.*, 2016; Öztürk *et al.*, 2011).

Por otro lado, se han realizado ensayos *in vitro*, descubriéndose así otras propiedades biológicas del ácido rosmarínico, tales como la antibacteriana, antiviral, antialérgica y antimutagénica. Por su parte, los estudios *in vivo* muestran actividades antialérgica, anticancerígena y antitrombótica del ácido. Además, se ha comprobado que inhibe el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y evita la formación de coágulos de sangre. Asimismo, protege al hígado contra la hepatitis y de lesiones hepáticas, puede actuar como antiinflamatorio y como astringente y extractos de plantas con alto contenido en ácido rosmarínico se usan para tratar la artritis.

Por todos estos efectos beneficiosos del ácido rosmarínico, es necesario desarrollar métodos analíticos rápidos y eficientes para el análisis de este compuesto. En este sentido, han sido propuestas distintas técnicas analíticas para analizar el ácido en los extractos de plantas entre los cuales cabe mencionar los métodos

espectrofotométricos (Ondrejovic *et al.*, 2012), la espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (Stehfest *et al.*, 2004), la electroforesis capilar (Baskan *et al.*, 2007; Bonoli *et al.*, 2003), los métodos electroquímicos (Gonzalves *et al.*, 2011) y la cromatografía líquida de alta eficacia (Adham, 2015; Couto *et al.*, 2011; Guédon *et al.*, 1194; Liu *et al.* 2013; Natsume *et al.*, 2006).

En este trabajo se desarrolla una metodología para extraer el ácido rosmarínico por lixiviación, seguido de una extracción en fase sólida y separado y cuantificado mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia con detección por absorción molecular.

1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía líquida (LC) desarrollada, por primera vez, por el botánico ruso Tswett, en sus experimentos para la separación de pigmentos de plantas, surgió como una técnica preparativa ideada para el aislamiento y purificación de compuestos naturales y sintéticos. No obstante, actualmente, es una de las técnicas analíticas más empleadas para separar e identificar compuestos en matrices de diferentes naturalezas (Unger *et al.*, 2010).

A partir del año 1930, esta técnica se desarrolla permitiendo la identificación de sus distintas variantes, que son: la cromatografía de adsorción, de reparto, de intercambio iónico y exclusión por tamaño. En todos estos casos, la separación del analito de interés depende de su interacción con las fases móvil y/o estacionaria (Cela *et al.*, 2010).

Sin embargo, la LC sufrió un relativo estancamiento a partir del año 1952, debido al impulso del desarrollo de la cromatografía de gases (GC), una técnica altamente resolutive y selectiva, pero solo aplicable para separar sustancias volátiles y térmicamente estables. Pese a lo anterior, las limitaciones de la GC, en cuanto al tipo de muestras analizables, incentivó el desarrollo de la LC, apareciendo así la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Si bien las bases teóricas de la HPLC y la LC son comunes, ambas se diferencian en que la primera es una técnica más rápida, sensible y selectiva totalmente

automatizada que emplea una instrumentación más compleja y sofisticada (Cela *et al.*, 2010).

En la actualidad, las técnicas cromatográficas están orientadas hacia la obtención de separaciones más rápidas, eficientes y miniaturizadas. En este sentido, se ha conseguido fabricar fases estacionarias con partículas con diámetro inferior a 2 μm , dando lugar a la cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC). En esta nueva modalidad, se trabaja con volúmenes más pequeños y flujos de fase móvil más rápidos, con lo que se reduce el tiempo del análisis y se mejora la resolución. No obstante, esta técnica requiere utilizar instrumentos más sofisticados, con bombas capaces de soportar las altas presiones de trabajo, sistemas de inyección que permitan inyectar volúmenes más pequeños de muestra y sistemas de detección altamente selectivos (Unger *et al.*, 2010).

Por otra parte, han surgido las micro y nano-cromatografías que son las versiones miniaturizadas de la LC y que permiten trabajar con flujos de fase móvil en el intervalo 1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 100-1000 nL/min . Dichas técnicas permiten reducir, significativamente, el consumo de disolvente, la cantidad de muestra necesaria y el tiempo de análisis, a la vez que aumenta la sensibilidad, mejorando los límites de detección (Unger *et al.*, 2010).

En estas técnicas cromatográficas, la selección del detector es fundamental, pues proporciona información sobre la presencia de las especies separadas en la columna cromatográfica. A este respecto, el detector más usual en los laboratorios es el de absorción UV-Visible, mientras que el menos frecuente es el de fluorescencia (FD) que es altamente selectivo, pero está limitado a las especies fluorescentes o que pueden derivatizarse como tales. No obstante, indiscutiblemente, el espectrómetro de masas (MS) es el mejor sistema de detección disponible en la actualidad, debido a su carácter universal y su elevada sensibilidad y selectividad. De hecho, la LC-MS se establece como una técnica híbrida, fundamental en la identificación de las especies separadas (Cela *et al.* 2010).

En cuanto a la aplicación de la LC en el análisis de ácido rosmarínico en extractos de plantas medicinales, la HPLC-PDA ha sido la técnica más empleada (Couto *et al.* 2011; Guédon *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2011), operando en fase inversa y utilizando columnas C18. En cuanto a las fases móviles, se emplean mezclas de Acetonitrilo: H₂O acidificadas, tanto en elución isocrática como de gradiente (Couto *et al.* 2011; Guédon y Bernard, 1994; Gudzenko, 2013; Canelas y Teixeira da Costa, 2007), y de metanol: H₂O acidificada en elución de gradiente (Wang *et al.*, 2004; Öztürk *et al.*, 2011). Otros detectores empleados son el espectrómetro de masas (Natsume y cols., 2006) y el DAD (Liu *et al.*, 2013; Canelas y Teixeira da Costa, 2007; Wang *et al.*, 2004).

1.2 Extracción sólido-líquido

La extracción de un constituyente soluble de un sólido por medio de un disolvente se denomina extracción sólido-líquido o lixiviación. El método utilizado para la extracción está determinado por la proporción del componente soluble presente, su distribución en el sólido, la naturaleza de dicho sólido y el tamaño de partícula. Los métodos tradicionales de extracción sólido-líquido se pueden dividir en dos grupos:

i) Métodos que no necesitan aporte de calor, reconociéndose aquí la extracción simple y la extracción asistida por ultrasonidos (UAE). Ésta técnica utiliza ondas de ultrasonido para agitar la muestra sumergida en el disolvente orgánico. Con este procedimiento, se disminuye el tiempo de extracción debido al incremento producido en la presión y la temperatura, favoreciendo la solubilidad y difusividad (Cela *et al.*, 2010). La UAE se considera un proceso ecológico que acelera la extracción y reduce el consumo de energía (Bellumori *et al.*, 2016).

ii) Métodos que requieren un aporte de calor, entre los que se encuentran el método *Soxhlet*, el *Soxtec System TH* y el *Soxhlet* asistida por microondas.

- La extracción *Soxhlet* ha sido el método estándar de extracción de muestras sólidas más empleado desde su diseño y, en la actualidad, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos. Este procedimiento

favorece la solubilidad de los analitos, no depende de la matriz y la metodología empleada es simple. Sin embargo, requiere como mínimo doce horas de trabajo, el uso de una gran cantidad de disolvente, la descomposición térmica de los analitos termolábiles y no es una técnica fácilmente automatizable (Cela *et al.*, 2010).

- La extracción *Soxtec System TH* es un sistema automatizado que permite realizar la extracción en un tiempo más corto y la precisión obtenida es similar al de *Soxhlet* convencional. Este procedimiento es más rápido que el método anterior ya que se requiere unas dos horas por muestra. Además, se utiliza menos cantidad de disolvente y la eficacia de la extracción es similar a la obtenida con el *Soxhlet* (Cela *et al.*, 2010).

- La extracción *Soxhlet* asistida por microondas es una modificación del método *Soxhlet* que mantiene las ventajas del método tradicional y supera las limitaciones comentadas. Igualmente, se disminuye el tiempo de extracción y la eficacia y reproducibilidad del proceso es comparable a la obtenida con la extracción *Soxhlet* (Cela *et al.*, 2010).

En otro orden de cosas, a lo largo de los años, se han desarrollado nuevos métodos de extracción como la extracción asistida por microondas, la extracción acelerada con disolventes y la extracción con fluidos supercríticos.

La extracción asistida por microondas (MAE) hace uso de la radiación de microondas para extraer con disolventes transparentes los compuestos solubles procedentes de la muestra de interés, no necesariamente sólida. Es una técnica rápida y selectiva con recuperaciones similares o mejores a las obtenidas en los procesos convencionales. Además, requiere un menor consumo de energía, así como de disolventes y, en general, genera menos residuos, por lo que es respetuosa con el medio ambiente, promoviendo los principios de la química verde. Sin embargo, el coste de los equipos de extracción es elevado y es un método difícil de automatizar y de acoplar a otras técnicas analíticas (Cela *et al.*, 2010; Bellumori *et al.*, 2016).

Por su parte, la extracción acelerada con disolventes (ASE) es una técnica de preparación de muestras que combina la extracción con disolvente a temperaturas y

presiones elevadas, para extraer rápida y eficazmente analitos de matrices sólidas. Este proceso es rápido y disminuye significativamente el tiempo de extracción. También reduce el volumen de disolvente y el número de parámetros a optimizar (Cela *et al.*, 2010).

En lo concerniente a la extracción con fluidos supercríticos (SFE), se tiene que es una técnica que emplea un disolvente en condiciones supercríticas y que se puede acoplar fácilmente a otras técnicas analíticas. Respecto a la extracción *Soxhlet*, se reduce a minutos el tiempo de extracción y permite la posibilidad de extraer compuestos termolábiles. Asimismo, es una técnica selectiva que consigue recuperaciones superiores a las obtenidas en los métodos convencionales. Ahora bien, presenta dificultad para extraer compuestos polares e iónicos y requiere mayor complejidad técnica (Cela *et al.*, 2010).

En cuanto a los procesos para la extracción del ácido rosmarínico en plantas se proponen, principalmente, la infusión (Canelas y Teixeira da Costa, 2007; Mauri *et al.*, 2010), la maceración con metanol durante 6 días (Adham, 2015), la UAE (Adham, 2015, Janicsák *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2013, Couto *et al.*, 2011), la MAE (Bellumori *et al.*, 2016), SFE (Zibetti *et al.*, 2013, Peev, 2011) y la extracción *Soxhlet* (Öztürk *et al.*, 2011).

1.3 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) fue introducida en 1970 por Burnham quien la utilizó para extraer compuestos contaminantes del agua. Se trata de una técnica de preparación y tratamiento de muestra, basada en la retención selectiva de los analitos y en su posterior elución con un disolvente adecuado. Además de posibilitar la preconcentración de los analitos, también permite la limpieza de las muestras, su fraccionamiento en diferentes compuestos o grupos de compuestos, el almacenamiento de analitos que son inestables en un medio líquido o que tienen una elevada volatilidad, así como, llevar a cabo reacciones de derivatización entre grupos reactivos del analito y los grupos de la superficie del adsorbente (Fritz, 1999; Cela *et al.*, 2010).

La técnica se basa en la utilización de un adsorbente selectivo que retiene un analito concreto sobre su superficie mediante un proceso de adsorción. Una vez retenido, el adsorbente se lava con un disolvente adecuado con el objetivo de eliminar compuestos no deseados. Tras secar el adsorbente, se eluyen los analitos con un disolvente apropiado. El extracto se lleva a sequedad para concentrar el analito o para redisolverlo en un disolvente compatible con la técnica analítica que se vaya a emplear a continuación. La efectividad de la separación depende, principalmente, de la elección del sólido adsorbente y de los disolventes empleados en la elución (Cela *et al.*, 2010).

El adsorbente puede estar dispuesto en cartuchos o discos. En los cartuchos el adsorbente está recubriendo un soporte mientras que en los discos está inmovilizado en una membrana de microfibras y permiten flujos más altos de muestra y obtienen mayor eficiencia. La elección del adsorbente es un factor muy importante que dependerá del analito, del tipo de muestra y de cómo interacciona ésta con el adsorbente (Fritz, 1999).

Las interacciones entre el analito y la fase sólida pueden ser de tres tipos: apolares, polares e iónicas (Fritz, 1999).

-Interacciones apolares: esta interacción se produce entre las cadenas hidrocarbonadas del sólido adsorbente y los analitos de la muestra. Los adsorbentes más utilizados son las sílices modificadas C18 y C8.

-Interacciones polares: incluyen la formación de puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e interacciones π - π entre el adsorbente y los grupos funcionales de los analitos. Los adsorbentes típicos son la sílice no modificada o las sílices modificadas con grupos -CN, -NH₂ y -OH.

-Interacciones iónicas: se producen entre un analito con carga y un sólido adsorbente con grupos funcionales de carga opuesta. Las fases adsorbentes de intercambio iónico están formadas por un soporte de sílice o un polímero con los grupos funcionales enlazados.

La SPE requiere menor cantidad de disolvente y reactivos, consigue muy buenas recuperaciones, es más rápida y de fácil manipulación. Por otro lado, presenta mayor

selectividad, especificidad y reproducibilidad comparada con la extracción líquido-líquido. Además, se puede usar en combinación con otros sistemas de extracción, el procedimiento es más sencillo y admite posibilidad de automatización y de acoplarse a técnicas cromatográficas (Fritz, 1999; Cela *et al.*, 2010).

No obstante, la SPE cuenta con un inconveniente importante el cual estriba en la posibilidad de que otros componentes de la matriz afecten a la interacción del analito con el adsorbente. De igual modo, los compuestos oleosos, las biomoléculas de cadenas largas y/o partículas sólidas muy pequeñas presentes en la matriz pueden obstruir el cartucho, impidiendo la retención del analito e influyendo, negativamente, en el rendimiento de la extracción. Ante estas limitaciones, en 1989, surge la microextracción en fase sólida (SPME) desarrollada por Belardi y Pawliszyn. Se basa en la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria absorbente polimérica. La fibra se expone a la muestra acuosa o gaseosa a analizar hasta alcanzar el equilibrio entre el analito y la fibra. Posteriormente, el analito es desorbido de la fibra para ser separado y analizado por GC, HPLC o electroforesis capilar (Fritz, 1999).

La SPME es un método respetuoso con el medio ambiente, promoviendo la química verde y sus principios a través de la reducción de los costos y del consumo de disolventes orgánicos durante el pretratamiento de las muestras entre otros factores. Asimismo, se caracteriza por su versatilidad y simplicidad de uso, ya que integra el proceso de preconcentración y extracción en una única etapa, así como ser fácilmente automatizable.

Por otra parte, ha surgido la versión miniaturizada de la SPE, la extracción en fase sólida miniaturizada (M-SPE) que emplea discos que pueden tener 1,2 mm de altura y 0,7 mm de diámetro colocados en una jeringa Hamilton. Esta técnica reduce la cantidad de muestra a un rango de 0,5-2,5 mL y de eluyente a 5-10 μ L (Fritz, 1999).

La aparición de técnicas miniaturizadas ha supuesto un gran avance con respecto al pretratamiento de muestras complejas, minimizando los errores asociados a los procesos que implican numerosas etapas, así como, disminuyendo la cantidad de

disolventes y reactivos tóxicos que se puedan emplear. En definitiva, son técnicas que cada vez más están en sintonía con los principios de la química verde.

La metodología más empleada de SPE en el proceso de extracción del ácido rosmarínico utiliza cartuchos C18 y como eluyente metanol. (Gudzenko, 2013, Öztürk *et al.*, 2011, Lau *et al.*, 2014). También se ha empleado sílica gel como adsorbente y una mezcla de dietiléter: ácido acético como eluyente (Ondrejovic *et al.*, 2012).

2. Objetivos del trabajo

El presente trabajo final de grado tiene como objetivo principal desarrollar un método analítico que permita separar y cuantificar el ácido rosmarínico mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por absorción molecular. Para lograr este propósito, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una búsqueda bibliográfica de las diferentes metodologías analíticas aplicadas para determinar el ácido rosmarínico en plantas, centrándose en los trabajos que empleen técnicas cromatográficas.

- Hacer uso de la HPLC usando un detector UV para separar y determinar el ácido rosmarínico, optimizando las condiciones cromatográficas de separación y detección.

- Aplicar el procedimiento de SPE para limpiar la muestra antes de inyectar en el cromatógrafo con el fin de separar el ácido rosmarínico en plantas.

- Realizar el estudio de estabilidad del ácido rosmarínico, teniendo en cuenta los factores luz y temperatura.

- Determinar el factor de recuperación del proceso de SPE.

- Optimizar el tiempo de extracción en la lixiviación.

- Hacer el estudio de repetibilidad, obtener los parámetros de calibración instrumental y establecer los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método.

- Demostrar la aplicabilidad de la metodología analítica desarrollada en muestras de plantas medicinales.

3. Parte experimental

3.1 Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones

- Ácido rosmarínico de pureza superior al 95 % para HPLC (BioVision). Se preparó una disolución patrón acuosa de 74 ppm del analito y se conserva en la oscuridad a 8 °C. Las disoluciones de trabajo se preparan a las concentraciones deseadas mediante dilución con la fase móvil empleada en el sistema cromatográfico (H₂O: Acetonitrilo 80:20 (v:v) a pH=2,5).

- Ácido fórmico 90 % (p/p) (Merck).

- Agua Milli-Q (resistividad de 18,2 MΩ·cm) obtenida utilizando un equipo Milli-Q Gradient A10 (Merck Millipore).

- Acetonitrilo LiChrosolv® para HPLC (Merck).

- Disoluciones tampón de pH 4 y 7 para calibrar el pH-metro.

- Disolución 0,1 M de ácido clorhídrico (HCl).

- Metanol de pureza superior a 99 % (Scharlau) .

3.2 Materiales

- Vaso de precipitados de 25, 50 y 100 mL.

- Probeta de 100 mL.

- Pipeta graduada de 2 mL.

- Cartuchos de extracción en fase sólida Hypersep C18 (Thermo Scientific™).

- Disco de filtración desechable 0,2 µm y 0,45 µm.

- Embudo.

- Viales de 5 ml con tapas.

- Jeringas desechables de 5 mL.
- Matraces de 10 y 50 mL.
- Columna SUPELCOTM LC-18 de 150 mm de longitud, 4,0 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula (SUPELCOTM).
- Jeringa Hamilton de 100 µL.
- Colector de vacío (Phenomenex).
- Mortero.

3.3 Equipos

3.3.1 Instrumentos

- Balanza analítica modelo ER-182A de precisión 0,1 mg y capacidad máxima de pesada 180 g (AND).
- Micropipetas DISPen-VAR de volumen variable con puntas de plásticos desechables de 20-200 µL y 100-1000 µL.
- pH-metro portátil PH 25 (Crison).
- Para realizar la separación y determinación del ácido rosmarínico se utiliza un sistema HPLC (Agilent Technologies 1220 Infinity LC) que consta de una bomba reciprocante de doble pistón, un inyector manual con un loop de 20 µL y un detector de diodos UV.

3.3.2 Aparatos

- Sistema de purificación de agua modelo Milli-Q gradient A10 (Merck Millipore).
- Baño de ultrasonidos modelo USC-T (VWR).
- Placa calefactora tiKappa (Ardes)

3.3.3 Programas informáticos

- Programa 1220 Infinity (Agilent Technologies 1220 Infinity LC) del instrumento de HPLC para la visualización y análisis de los cromatogramas.
- Programa Microsoft® Office Excel 2016 para el tratamiento de los datos.
- Programa Microsoft® PowerPoint 2016 para la representación de los cromatogramas obtenidos.

3.4. Muestras

Las muestras que fueron analizadas para la realización de este trabajo fueron de romero (*Rosmarinus officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*), espliego (*Lavandula angustifolia*) y menta (*Mentha piperita*). Todas ellas fueron adquiridas en un comercio local y se conservaron a temperatura ambiente

3.5. Procedimientos experimentales

- Separación cromatográfica

Las condiciones establecidas a continuación son las óptimas para la separación y cuantificación del ácido rosmarínico. La fase móvil utilizada es H₂O:Acetonitrilo 80:20 (v:v) a pH=2,5, usando ácido fórmico para alcanzar este pH. El flujo de fase móvil y el volumen de inyección es 0,8 mL/min y 20 µL, respectivamente. La longitud de onda de detección seleccionada es 340 nm.

- Tratamiento de las muestras

Lixiviación

Para llevar a cabo la lixiviación se aplica el procedimiento propuesto por Mauri y colaboradores (Mauri *et al.*, 2010). Se pesa 1,0 g de la planta seca, previamente triturada en un mortero y se sumerge en 40 mL de agua calentada a ebullición durante 5 minutos. Se filtra con papel de filtro, recogiendo la disolución en un matraz aforado de 50 mL y se enraza con agua destilada.

Extracción en fase sólida

Para la SPE se sigue el procedimiento desarrollado por Nilgün y colaboradores (Nilgün *et al.*, 2011). En primer lugar, se acondiciona la columna de extracción con 3 mL de metanol, 3 mL de agua destilada y 3 mL de HCl 0,1 M. Seguidamente, Se pasa por el cartucho de extracción 1 mL de muestra, previamente filtrada con filtro de 0,2 μm , se lava con 2 mL de HCl 0,1 M y se seca a vacío. A continuación, se eluye el analito con 2 mL de metanol, recogiénose en un vial para su evaporación hasta sequedad con corriente de aire. Finalmente, el residuo se disuelve en 1 mL de la fase móvil y se inyecta en el cromatógrafo.

4. Resultados y discusión

4.1 Características del ácido rosmarínico

En 1958 y por primera vez, los químicos italianos, Scarpati y Oriente aislaron el ácido rosmarínico en el romero, surgiendo de ahí el nombre del ácido. Respecto a su estructura química, Figura 1, el ácido rosmarínico es un éster del ácido cafeico y del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidroxiopropanoico (Petersen y Simmonds, 2003) que pertenece a la familia de compuestos fenólicos con un grupo carboxilo.

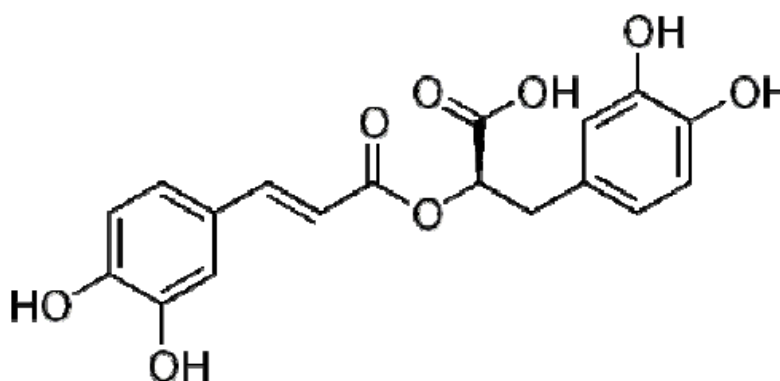


Figura 1. Estructura química del ácido rosmarínico.

En la Tabla 1 se recogen las propiedades más importantes del ácido rosmarínico. Su constante de disociación indica que a pH superiores a 3,5 se encuentra en su forma ionizada. Por ello, es necesario trabajar a pH inferiores para garantizar la interacción entre el analito y la fase C18 enlazada a la sílice en el cartucho de SPE. En su forma neutra el ácido rosmarínico es más soluble en disolventes orgánicos como etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilformamida que en agua.

Tabla 1. Principales características físico-químicas del ácido rosmarínico.

Fórmula	PM (g/mol)	Punto de fusión (° C)	Densidad (mg/cm ³)	pK _a
C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360,318	171-175	1,547	3,57

Fuente: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

En la Figura 2 se muestra el espectro de absorción en el UV para el ácido rosmarínico, siendo 221, 291 y 340 nm las longitudes de onda donde se alcanzan los máximos de absorción¹.

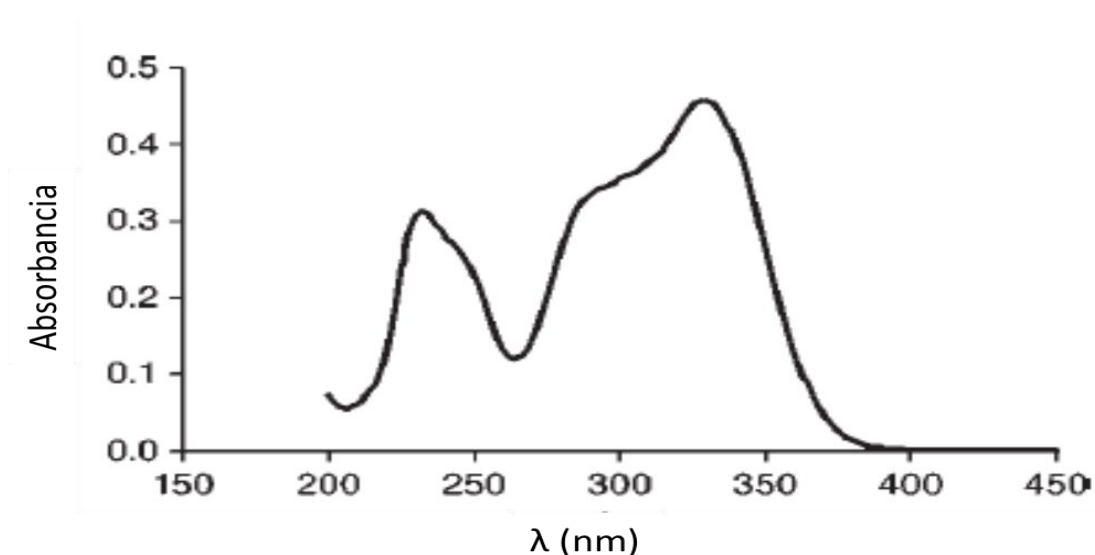


Figura 2. Espectro de absorción del ácido rosmarínico. Obtenido de Canelas y Teixeira da Costa (Canelas y Teixeira da Costa, 2007)

4.2 Estudio de estabilidad del ácido rosmarínico

Numerosos artículos recomiendan mantener las disoluciones de ácido rosmarínico en frío y en la oscuridad (Nilgün *et al.*, 2011; Öztürk *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2004). Por eso se decide realizar un estudio de estabilidad del ácido en la fase móvil, teniendo en cuenta los factores temperatura y luz.

Para ello, se prepara una disolución de ácido rosmarínico en la fase móvil y se inyecta en el HPLC justo después de su preparación. Se toman dos alícuotas de la disolución, se dejan a temperatura ambiente y una de ellas se mantiene protegida de la luz. El resto de la disolución se deja en la nevera a 8°C y en la oscuridad. En la Tabla 2,

¹ Longitudes de onda obtenidas en National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database.

se muestra el porcentaje de ácido rosmarínico encontrado en cada alícuota al inyectarlas a los tres días en el HPLC.

Tabla 2. Estudio de estabilidad

Alícuota	Ácido rosmarínico encontrado (%)
Expuesta a la luz y a temperatura ambiente	85
Ocultada de la luz y a temperatura ambiente	90
Ocultada de la luz y en la nevera	100

La pérdida detectada se atribuye a la hidrólisis del éster (Öztürk *et al.*, 2010). Por lo anterior, las disoluciones se preparan el mismo día de su utilización o se mantienen en la nevera y en la oscuridad.

4.3 Separación cromatográfica

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio para optimizar las condiciones de la separación cromatográfica del ácido rosmarínico. El instrumento de HPLC que se utilizó en este trabajo no permite la elución en gradiente, por ello, a tenor de lo desarrollado en los trabajos publicados consultados, se eligió de fase móvil una mezcla compuesta por 30 % de acetonitrilo y 70 % de una disolución acuosa de acetonitrilo (acetonitrilo (2,5 %, v/v) y ácido fórmico (0,5 %, v/v)) (Canelas y Teixeira da Costa, 2007). El pH de la fase anterior es 2,26 y la columna empleada soporta pH comprendidos entre 2 y 7,5, por lo que se decide disminuir la cantidad de ácido fórmico a la mitad, para no trabajar tan cerca de las condiciones críticas de la columna. Se preparó la nueva fase móvil compuesta por 30 % de acetonitrilo y 70 % de una disolución acuosa de acetonitrilo (acetonitrilo (2,5 %, v/v) y ácido fórmico (0,25 %, v/v)). El pH resultante es 2,50. Este pH permite que el ácido rosmarínico esté completamente en su forma neutra, lo que facilita su identificación y posterior cuantificación.

El flujo de la fase móvil se fijó en 0,6 mL/min debido a que la columna empleada es 100 mm menor que la utilizada en el trabajo de referencia que fija el flujo en 1 mL/min. La longitud de onda de detección (λ) seleccionada fue 254 nm (Canelas y Teixeira da Costa, 2007). La Figura 3 muestra el cromatograma obtenido al inyectar en estas condiciones una disolución estándar de ácido rosmarínico.

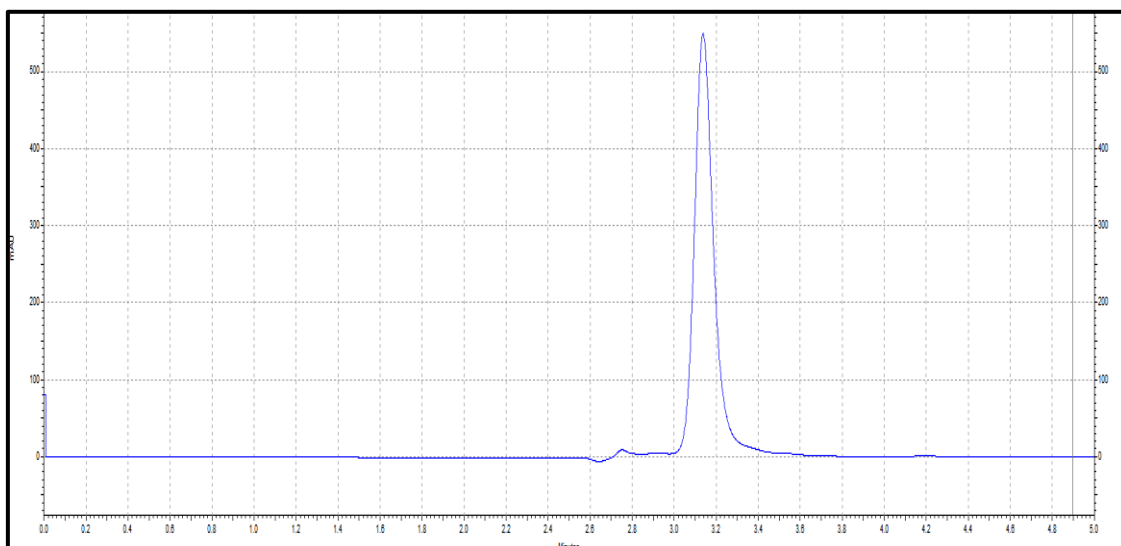


Figura 3. Cromatograma de la disolución estándar de ácido rosmarínico, $\lambda= 254$ nm ($t_R=3,14$ min).

La longitud de onda de máxima absorbancia es 340 nm (Figura 2), por lo que se hizo un nuevo análisis de la disolución estándar a dicha longitud de onda. La Figura 4 presenta el cromatograma resultante en el que se observa un aumento de la altura del pico. Además, al integrar el pico se obtuvo que el área duplicó el área calculada cuando la longitud de onda es 254 nm. Teniendo en cuenta que se incrementa la sensibilidad se fijó en 340 nm la longitud de onda de detección.

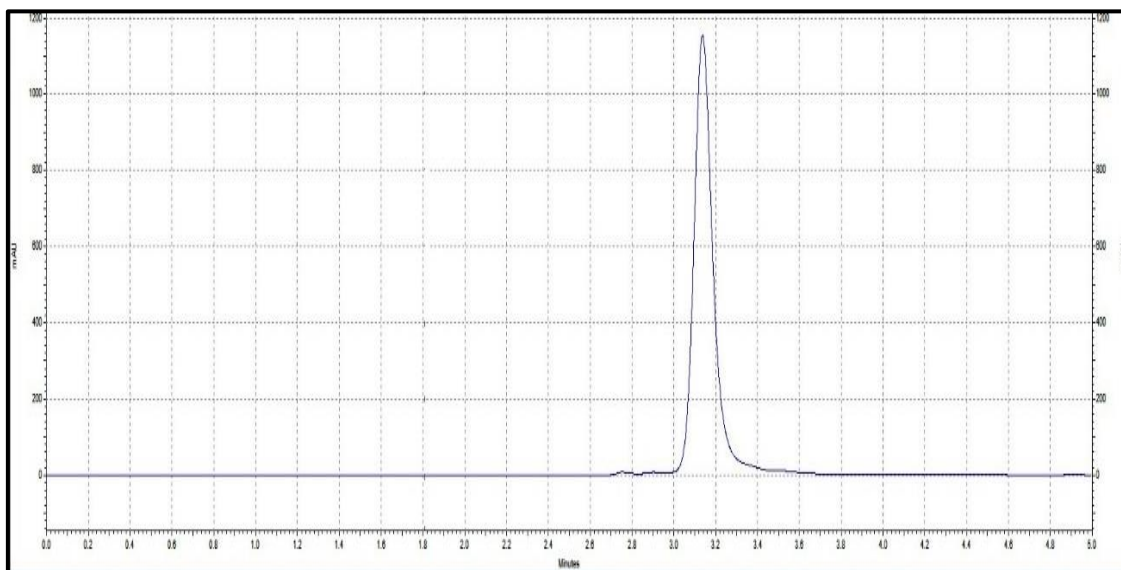


Figura 4. Cromatograma de la disolución estándar de ácido rosmarínico , $\lambda= 340$ nm (t_R 3,14 min).

Lo siguiente es saber si estas condiciones permiten detectar y separar el ácido rosmarínico en una planta. Por ello, se hizo la lixiviación indicada anteriormente para la muestra de romero, y se inyectó en el instrumento, previamente filtrada con un filtro de 0,2 micras. La Figura 5 refleja el cromatograma obtenido. Se observa que la resolución no es buena y la línea base no está estable. Para poder identificar el pico correspondiente al ácido rosmarínico se añadió una cantidad pequeña de ácido al vial con el extracto y se inyectó al instrumento, comprobando que es el pico con tiempo de retención (t_R) 3,10 min.

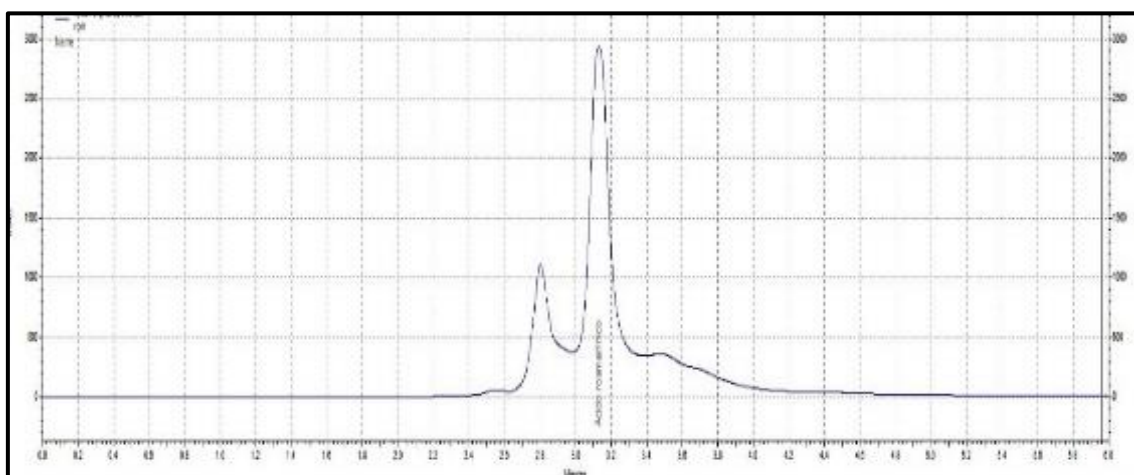


Figura 5. Cromatograma del lixiviado de una muestra de *Rosmarinus officinalis*

Por lo anterior, se decidió hacer la extracción en fase sólida antes de inyectar en el instrumento con el fin de limpiar la muestra de romero y así mejorar la resolución y separación del ácido rosmarínico. En la Figura 6 se muestra el cromatograma obtenido al inyectar la muestra preparada por SPE.

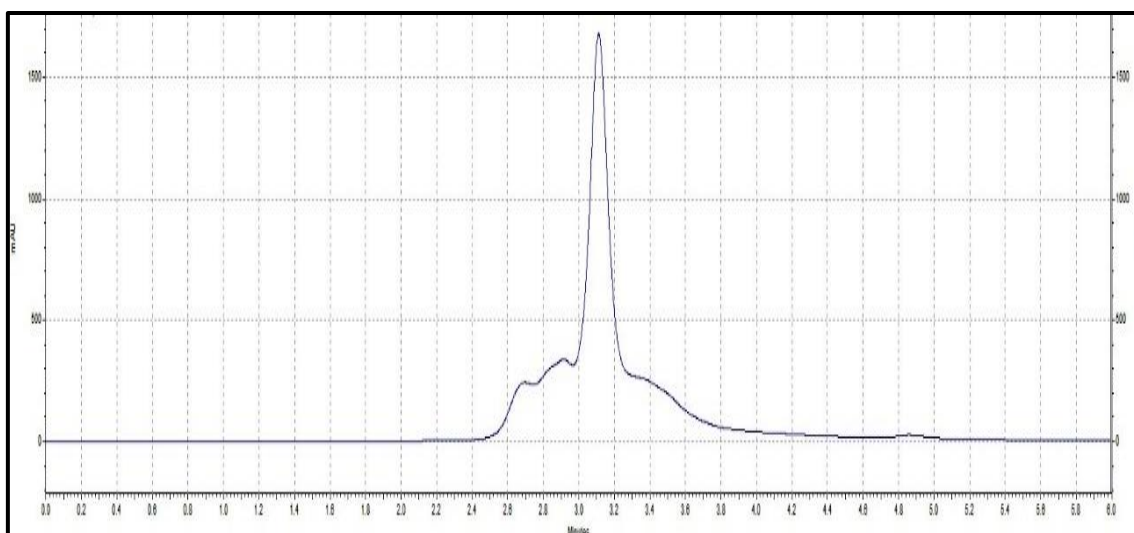


Figura 6. Cromatograma de una muestra de *Rosmarinus officinalis* después de la SPE.

Como se comprueba en el cromatograma anterior, la línea base no permanece estable y la resolución es pésima, por lo que se decidió cambiar la polaridad de la fase

móvil. Así, se estableció como fase móvil una mezcla de H₂O:Acetonitrilo 80:20 (v:v) llevada a pH 2,5 con ácido fórmico. Se inyectó la muestra de romero anterior fijando el flujo de la fase móvil en 0,8 mL/min y se obtuvo el cromatograma de la Figura 7. Para identificar el pico que corresponde al ácido rosmarínico, se enriqueció la muestra y se inyectó en el cromatógrafo, obteniéndose que la única área que aumenta es la correspondiente al pico con tiempo de retención 4,325 minutos.

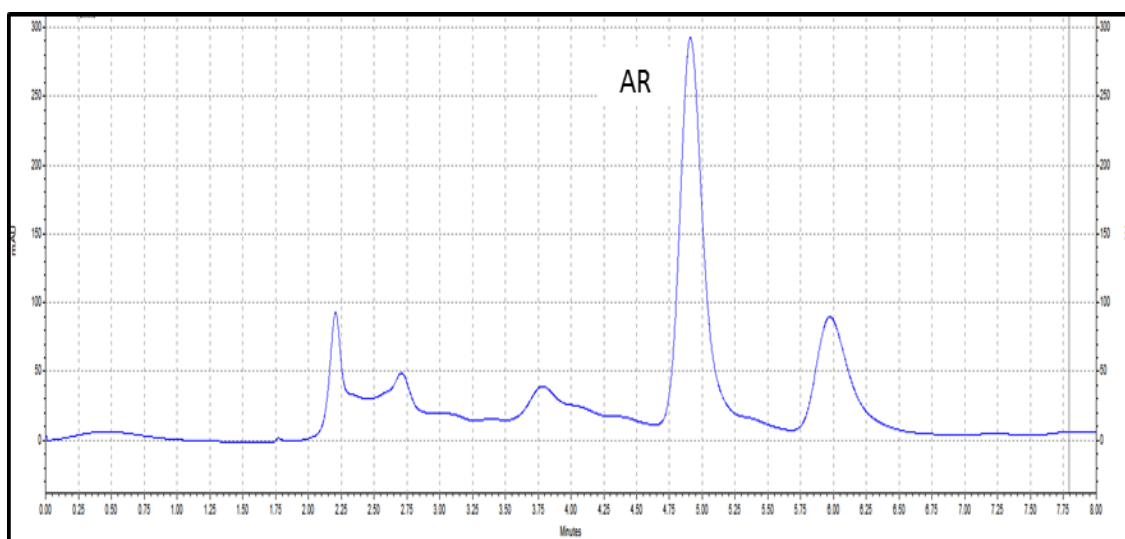


Figura 7. Cromatograma de una muestra de *Rosmarinus officinalis* al hacer la SPE. Composición fase móvil H₂O:Acetonitrilo 80:20 (v/v) pH 2,5 (AR: ácido rosmarínico).

Las resoluciones calculadas entre el pico anterior y el ácido rosmarínico y entre el ácido rosmarínico y el pico posterior son 1,34 y 1,14, respectivamente. El parámetro determinado es inferior a 2 y superior a 1 en ambos casos, por tanto, los resultados son aceptables, pero no óptimas (Couto *et al.*, 2011).

Con el objeto de conseguir resoluciones óptimas, se modificó el flujo de la fase móvil, implementando la siguiente rampa con el fin de mejorar la resolución. Durante 3,5 minutos el flujo se mantuvo a 0,8 mL/min. En el siguiente minuto y medio, se varió el flujo a 0,6 mL/min. Durante los últimos minutos, se fijó el flujo a 0,8 mL/min. La Figura 8 muestra el cromatograma de la muestra de romero con las condiciones indicadas.

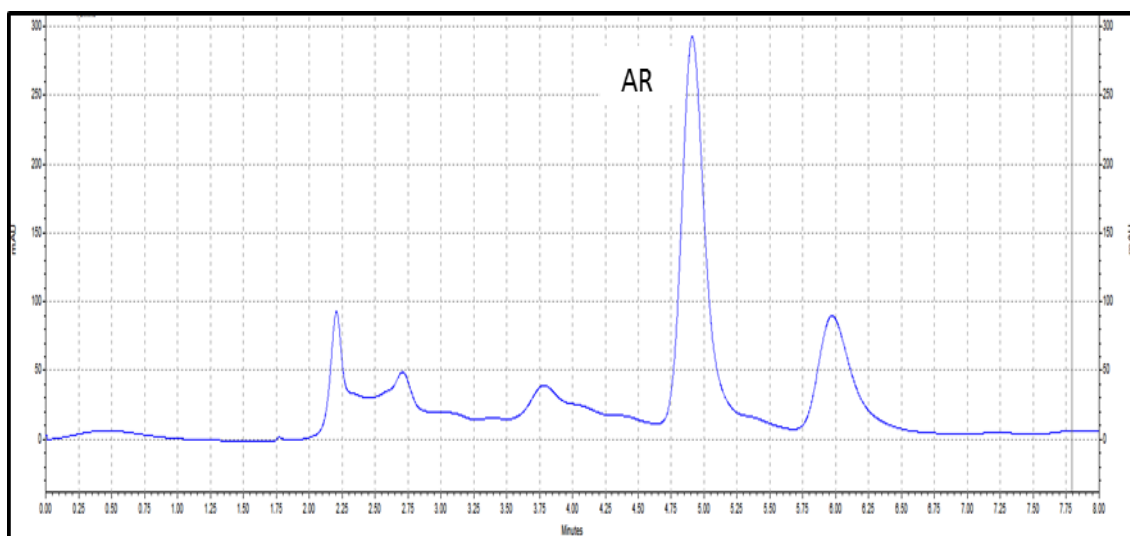


Figura 8. Cromatograma de una muestra de *Rosmarinus officinalis* al aplicar la rampa de flujo (AR: ácido rosmarínico).

En este caso la resolución entre el ácido rosmarínico y el pico anterior es 1,47 y 1,11 entre el ácido rosmarínico y el pico posterior. Como prácticamente no varía la resolución, se decidió trabajar sin cambiar el flujo de la fase móvil.

Recopilando lo anterior, se tienen las siguientes condiciones óptimas para la separación cromatográfica (Figura 7):

- La fase móvil está compuesta por H₂O:Acetonitrilo 80:20 llevada a pH 2,5 con ácido fórmico.

- El flujo de fase móvil y el volumen de inyección es 0,8 mL/min y 20 µL, respectivamente.

- La longitud de onda de detección es 340 nm.

La Figura 9 presenta el cromatograma de una disolución estándar de ácido rosmarínico de 40 ppm. En las condiciones comentadas, el tiempo de retención del ácido rosmarínico es 4,211 minutos.

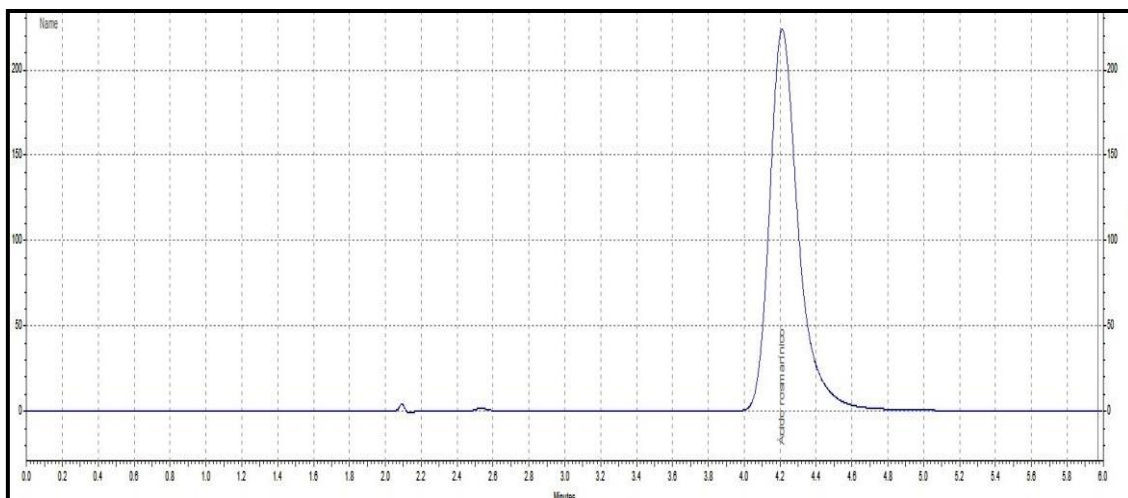


Figura 9. Cromatograma de una disolución estándar de 40 ppm de ácido rosmarínico (t_R 4,211 min)

En la Tabla 3 se muestra los resultados calculados de factor de capacidad (k'), el número de platos de la columna (N) y la altura equivalente a un plato teórico (H) asociados al cromatograma de la disolución estándar de 40 ppm de ácido rosmarínico.

Tabla 3. Parámetros cromatográficos de la Figura 9.

t_R (min)	k'	N	H (cm)
4,211	1,01	350	0,04

El factor de capacidad está comprendido entre 1 y 2, resultando aceptable, pero no ideal el valor obtenido. En cuanto a la eficacia dada por el número de platos, ésta debe ser superior a 2000 (Couto *et al.*, 2011), sin embargo, en este caso es casi 6 veces menor, lo que implica que la capacidad de separación de picos solapados es menor.

4.4 Estudio de repetibilidad y calibrado

Una vez optimizada la separación cromatográfica, se realizó un estudio de repetibilidad tanto en el mismo día (intradía) como en días distintos (interdía). En el primer caso, se realizaron tres inyecciones consecutivas (n=3) a dos niveles de concentración de ácido rosmarínico a partir de la disolución patrón, siendo elegidas las concentraciones de 5 ppm y de 40 ppm como nivel bajo y alto, respectivamente. Para la repetibilidad interdía, se inyectaron tres días consecutivos ambos niveles de concentración (n=9). Para los dos casos se calcularon las desviaciones estándar relativas (RSDs) para los tiempos de retención y las áreas de pico (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Repetibilidad intradía e interdía de los tiempos de retención y las áreas de pico obtenidas para el nivel bajo de concentración (5 ppm).

Precisión intradía (n=3; RSD %)						Precisión interdía (n=9; RSD %)	
t_R			Área			t_R	Área
Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3		
0,2	0,4	0,3	0,5	0,6	0,3	0,8	3,9

Tabla 5. Repetibilidad intradía e interdía de los tiempos de retención y las áreas de pico obtenidas para el nivel alto de concentración (40 ppm).

Precisión intradía (n=3; RSD %)						Precisión interdía (n=9; RSD %)	
t_R			Área			t_R	Área
Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3		
0,6	0,4	0,5	0,4	0,3	0,2	0,6	1,7

Como se puede observar, para el nivel bajo de concentración, los valores de RSDs para los tiempos de retención y las áreas de pico fueron inferiores a 0,4 y 0,6 %, respectivamente, en el mismo día, y 0,8 y 3,9% en días distintos. Para el nivel alto de

concentración, los resultados de RSDs para los tiempos de retención y las áreas de pico fueron inferiores a 0,5 y 0,4 %, respectivamente, en el mismo día y 0,6 y 1,7 % en días distintos. En todos los casos, los valores de RSDs no superan el 5% , lo que indica la adecuada repetibilidad instrumental.

A continuación, se realizó un calibrado instrumental inyectando por duplicado seis niveles de concentraciones diferentes (n=6). La curva de calibrado, Figura 10, se obtuvo representando las áreas de pico frente a las concentraciones de las disoluciones de ácido rosmarínico inyectadas. Las medidas experimentales obtenidas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Medidas experimentales del calibrado instrumental

Concentración (ppm)	Área (10 ⁵)
1	2,28
2	4,89
5	35,5
20	205
40	416
50	519

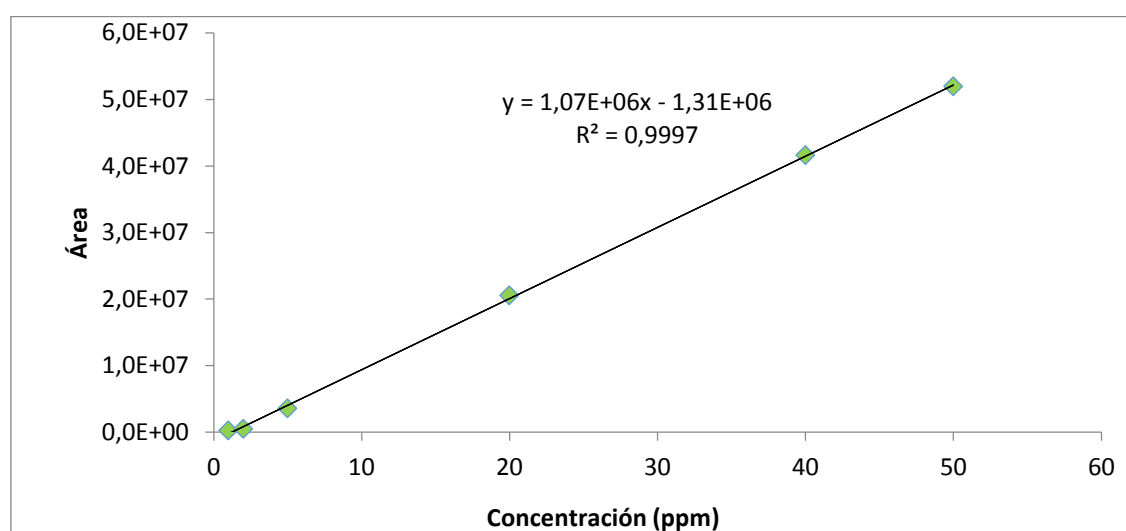


Figura 10. Recta de calibrado para el ácido rosmarínico.

El análisis de regresión por mínimos cuadrados genera el gráfico de residuos de la Figura 11, en el que se puede observar la distribución aleatoria de los residuos, así como, la compensación entre los residuos positivos y negativos.

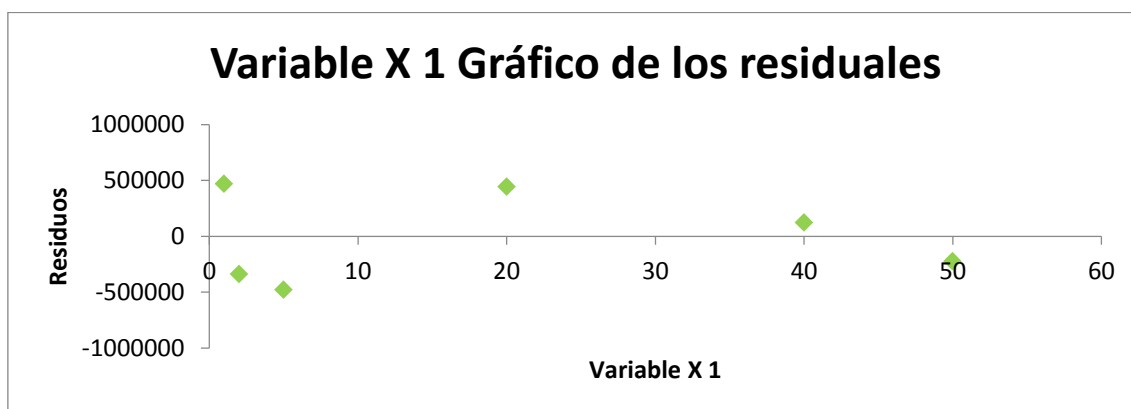


Figura 11. Gráfico de los residuos obtenidos en el calibrado del ácido rosmarínico.

En la Tabla 7, se recogen los datos de calibración obtenidos para el ácido rosmarínico, incluyendo el rango lineal de trabajo, los intervalos de confianza asociados a los parámetros de la ecuación de la recta para un nivel de confianza del 95 %, el coeficiente de correlación (R^2), la desviación estándar de los residuos ($s_{y/x}$) y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) instrumentales, calculados usando las expresiones [1] y [2], respectivamente, donde a es la pendiente de la curva de calibrado.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_{y/x}}{a} \quad [1]$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_{y/x}}{a} \quad [2]$$

Tabla 7. Parámetros de calidad del calibrado instrumental para el ácido rosmarínico.

Rango lineal (ppm)	Ecuación de la recta (n=6)		R ²	S _{y/x}	LOD ^(a) (ppm)	LOQ ^(b) (ppm)
	a ± S _a ·t _(0,05;4)	b ± S _b ·t _(0,05;4)				
1-50	1,07·10 ⁶ ± 2,68·10 ⁴	-1,31·10 ⁶ ± 7,37·10 ⁵	0,9997	4,54·10 ⁵	1,27	4,25

a) Calculado usando la expresión [1]. b) calculado usando la expresión [2]. a: pendiente. S_a: desviación estándar de la pendiente. b: ordenada en el origen. S_b: desviación estándar de la ordenada en el origen. R²: coeficiente de determinación. S_{y/x}: desviación estándar de los residuos.

Los resultados demuestran la linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado del nivel instrumental del método analítico empleado.

Con todo, los datos obtenidos mejoran los resultados conseguidos en el trabajo de Adham (Adham, 2015), quien desarrolla un proceso experimental de separación por HPLC similar al propuesto en estas páginas, consiguiendo un rango lineal de 5-200 ppm y LOD y LOQ iguales a 14,26 y 43,23 ppm, respectivamente. Por otra parte, respecto a los artículos propuestos por Gudzenko (Gudzenko, 2013), Öztürk y colaboradores (Öztürk *et al.*, 2011) y por Couto y colaboradores (Couto, *et al.*, 2011), se observa que la duración del análisis disminuye, pues en el mejor de los casos el tiempo de análisis es de 10 minutos.

4.5 Optimización del tiempo de extracción de la lixiviación

Con el propósito de conocer el tiempo óptimo de extracción del ácido rosmarínico en la lixiviación, se varió el periodo de tiempo en el que la muestra de romero se mantiene en agua hirviendo. Para ello, se realizó por triplicado para la misma cantidad de romero la lixiviación y la posterior SPE. Finalmente, se inyectó en el instrumento y se integraron los picos con el fin de comparar las áreas. En la Tabla 8 se indica el tiempo de la muestra en agua hirviendo y el área obtenida.

Tabla 8. Medidas experimentales de la lixiviación

Tiempo (min)	Área (10^6)
5	102,1
10	101,8
15	102,5

Para conocer la dispersión de las medidas obtenidas se calculó la RSD de las áreas de pico y se obtuvo que el resultado es 0,4 %, por tanto, se puede considerar que el ácido rosmarínico se extrajo en los primeros 5 minutos.

4.6 Estudio de recuperación de SPE

Con el fin de determinar el factor de recuperación de la SPE, se preparó una disolución de 20 ppm de ácido rosmarínico en agua Milli-Q, se realizó por triplicado el proceso de SPE explicado en el apartado referido a los procedimientos experimentales y se inyectó en el instrumento de HPLC. Se calculó el área del pico obtenido y por interpolación en la recta de calibrado se obtuvo la concentración recuperada.

El factor de recuperación se calculó como la relación entre la concentración obtenida después de la SPE y la concentración inicial de 20 ppm. Se obtuvo que el factor de recuperación expresado en porcentaje es 97,5 %, siendo este el valor medio de las tres extracciones.

Otra forma en la que se determinó el factor de recuperación fue enriqueciendo una muestra de romero con 10 ppm de ácido rosmarínico. Se realizó el proceso de lixiviación para dos muestras de romero, una enriquecida y la otra sin enriquecer. A continuación, se hizo la SPE para ambas muestras. Se inyectaron en el HPLC y se calcularon las áreas del pico de ácido rosmarínico. A partir, de la recta de calibrado se obtuvieron las concentraciones para ambas muestras. En este caso, se obtuvo que el factor de recuperación es 95,6 %.

Para calcular los límites del método y determinar la concentración de ácido rosmarínico en muestras de plantas, se tuvo en cuenta el factor de recuperación obtenido para la disolución acuosa (97,5%) por ser el ensayo que se realizó por triplicado.

4.7 Límites de detección y cuantificación del método

Los LOD y LOQ del método se calcularon a partir de los límites de detección y cuantificación del calibrado instrumental, teniendo en cuenta el factor de recuperación de la SPE obtenido para la disolución acuosa. Los límites de detección y cuantificación son 1,32 ppm y 4,38 ppm , respectivamente. Se ha diseñado un método que permite detectar concentraciones de ácido rosmarínico a partir de a 1,32 ppm.

4.8 Cuantificación de ácido rosmarínico en las muestras de plantas medicinales

El proceso experimental se realizó por triplicado en muestras de romero, salvia, espliego y menta. En la Figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos para estas plantas medicinales. Se observa que para todas las muestras se puede identificar el pico correspondiente al ácido rosmarínico y, para todos los casos, éste está ligeramente desplazado respecto del patrón ($t_R=4,211$). Este ligero desplazamiento también se percibe en los trabajos consultados (Adham, 2015; Öztürk *et al.*, 2011; Couto *et al.*, 2011).

Aplicación del proceso optimizado a muestras reales

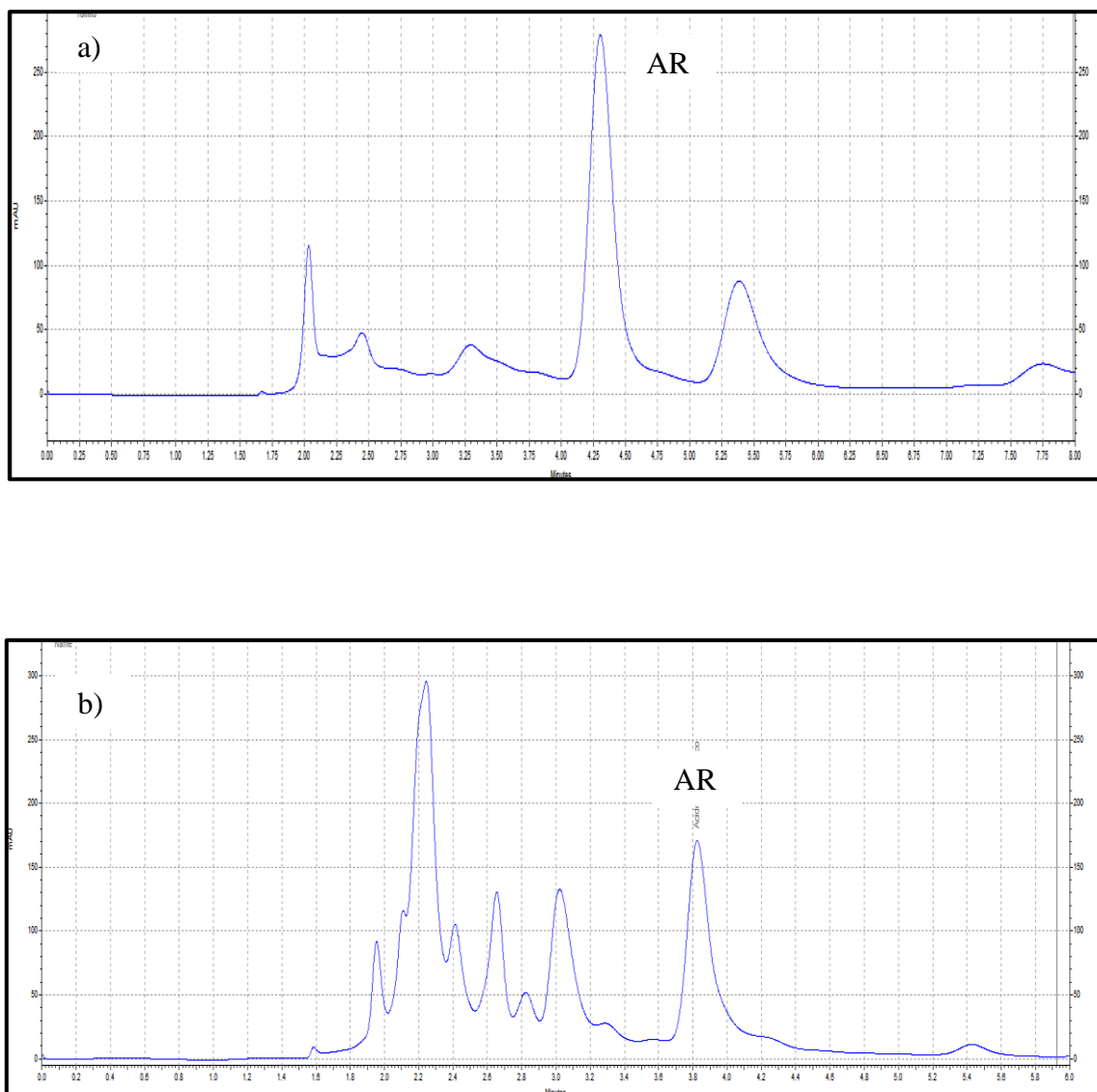


Figura 11. Cromatogramas de muestras reales siguiendo el procedimiento optimizado (AR: ácido rosmarínico). a) Romero b) Espliego c) Salvia d) Menta.

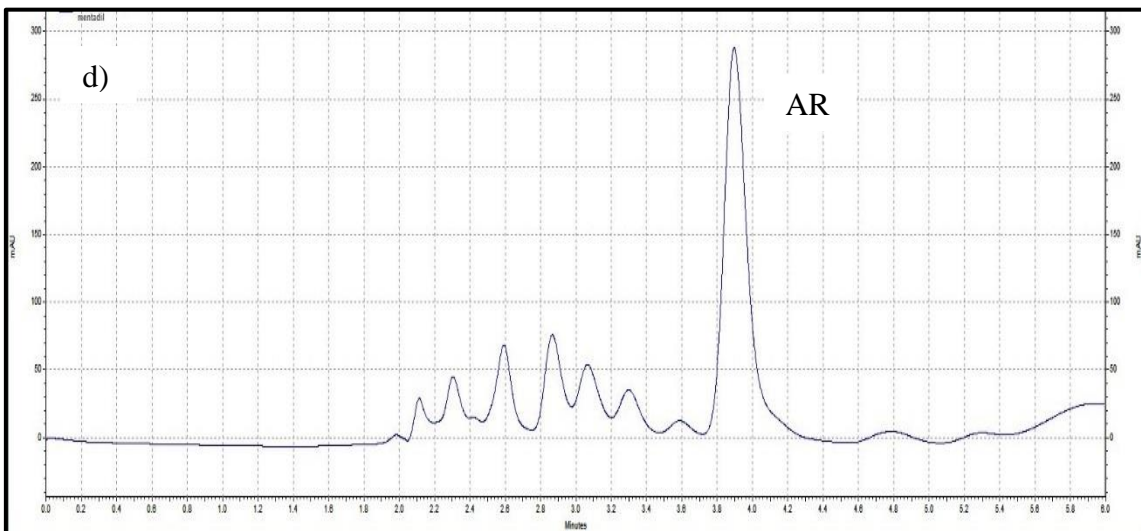
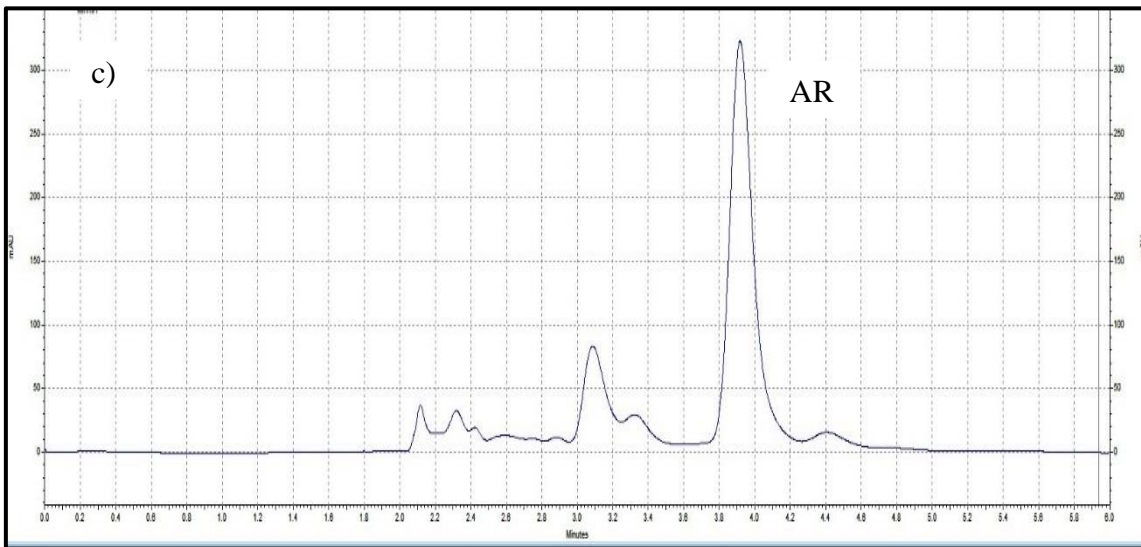


Figura 11. Continuación

Por otro lado, se pudo cuantificar el ácido rosmarínico en las muestras de romero, espliego y salvia. Sin embargo, no fue posible en la muestra de menta debido a la resolución del cromatograma.

La concentración del ácido rosmarínico se obtuvo a partir de los valores de área de pico por interpolación en la recta de calibrado, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y el factor de recuperación de la SPE. En la Tabla 9, se indica la concentración de ácido rosmarínico para las plantas analizadas, siendo superior la concentración de ácido rosmarínico en la muestra de romero analizada .

Tabla 9. Cuantificación del ácido rosmarínico en las plantas analizadas

Muestra	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) ^(a)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero)	11,99 \pm 0,04
<i>Lavandula angustifolia</i> (Espliego)	10,4 \pm 0,5
<i>Salvia officinalis</i> (Salvia)	0,55 \pm 0,03

(a) Media \pm SD de las tres réplicas, SD: desviación estándar

4.9 Perspectivas de trabajo futuras

En el trabajo realizado se extrajo el ácido rosmarínico de la planta haciendo una infusión, aunque se podría emplear cualquiera de los métodos propuestos en la bibliografía, con el fin conocer si el rendimiento de la extracción se ve mejorado. También, se puede optimizar la SPE para obtener un mejor factor de recuperación y validar la metodología desarrollada, siendo necesario realizar los estudios de exactitud y precisión y el calibrado del método.

Ahora bien, la separación cromatográfica emplea el uso de acetonitrilo que es un disolvente moderadamente tóxico y perjudicial para el medio ambiente, por lo que sería conveniente desarrollar una separación cromatográfica que lo reemplace, por ejemplo, por metanol un disolvente empleado en los trabajos publicados.

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo que sigue:

- Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de las diferentes metodologías analíticas aplicadas en el análisis del ácido rosmarínico en plantas medicinales, encontrándose que las técnicas cromatográficas, en particular, la HPLC-UV es la opción usada para la determinación y separación de este compuesto.

-Se ha comprobado la influencia de la temperatura y la luz en el ácido rosmarínico.

- Se ha empleado con éxito la HPLC usando un detector de diodos UV para separar y determinar el ácido rosmarínico con un tiempo de análisis inferior a 5 minutos. Para ello, se han optimizado tanto las condiciones de separación cromatográfica como las de detección.

- Se realizó el estudio de repetibilidad y se establecieron los parámetros de calibración instrumental, así como, los LOD y LOQ del método.

-Se ha establecido que el tiempo óptimo para la lixiviación es 5 minutos y que el factor de recuperación en la SPE es 97,5 %.

- Se ha desarrollado una metodología para la determinación y separación del ácido rosmarínico en plantas medicinales, capaz de detectar concentraciones de ácido rosmarínico superiores a 1,32 ppm y de cuantificar concentraciones superiores a 4,38 ppm.

-Se demostró la aplicabilidad de la metodología desarrollada, basándose en una lixiviación y posterior SPE para llevar a cabo la extracción del ácido rosmarínico en muestras de plantas y su posterior determinación mediante HPLC-UV.

6. Glosario

- ASE: extracción acelerada con disolventes
- DAD: detector de arreglo de diodos
- DMSO: dimetilsulfóxido
- FD: detector de fluorescencia
- GC: cromatografía de gases
- HCl: ácido clorhídrico
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia
- LC: cromatografía líquida
- LLE: extracción líquido-líquido
- LOD: límite de detección
- LOQ: límite de cuantificación
- MAE: extracción asistida por microondas
- MS: espectrometría de masas
- M-SPE: extracción en fase sólida miniaturizada
- PDA: detector de matriz de fotodiodos
- RSD: desviación estándar relativa
- SFE: extracción con fluidos supercríticos
- SPE: extracción en fase sólida
- SPME: micro extracción en fase sólida
- t_R : tiempo de retención
- UAE: extracción asistida por ultrasonido
- UHPLC: cromatografía líquida de ultra alta eficacia

7. Referencias

A

- Adham A. N. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2015**, 3(6), 130-139.

B

- Baskan S.; Öztekin N.; Erim F. B. *Food Chem.* **2007**, 101, 1748-1752.

- Bellumori M.; Innocenti M.; Binello A.; Boffa L.; Mulinacci N.; Cravotto G. *C. R. Chimie.* **2016**, 19, 699-706.

- Bonolli M.; Pelillo M.; Lercker G. *Chromatografia* **2003**, 57, 505-508.

C

- Canelas V.; Teixeira da Costa C. *J. Chem. Educ.* **2007**, 84, 1502-1504.

- Cela, R.; Lorenzo, R. A.; Casais M. C. *Técnicas de separación en química analítica*, 1ª ed.; Síntesis S. A.: Madrid, 2010.

-Coran S. A.; Mulas S.; Mulinacci N. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1220, 156-161.

- Couto R.O.; Conceição, E. C.; Chaul L.T. *Lat. Am. J. Pharm.* **2011**, 30(10), 1951-1956.

D

-Dogan S.; Diken E.; Dogan M. *J. Med. Plants Res.* **2010**, 4, 2566-2573.

E

- Ertas A.; Boga M.; Yilmaz M. A.; Yesil Y.; Tel G. *Ind. Crop. and Prod.* **2015**, 67,336-345.

- Exarchou V.; Troganis A.; Gerothanassis I. P.; Tsimidou M.; Boskou D. *J. Agric. Food Chem* **2001**, 49, 2-8.

F

- Fecka I.; Turek S. *Food Chem.* **2008**, 108, 1039-1053.

- Franzoi A. C.; Dupont J.; Spinelli A.; Vieira I.C. *Talanta* **2009**, 77, 1322-1327.

- Fritz, J.S. *Analytical Solid-Phase Extraction*; WILEY-VCH: U.S.,1999.

G

- Goncalves D.; Couto R: O.; Conceicao E. C.; Reis N. S.; Gil E. S. *Quim. Nova* **2011**, 34, 330-334.

- Gudzenko A. *J. Chem. Pharm. Res* **2013**, 5(9), 40-45.

H

-Hooker C. W.; Lott W. B.; Harrich D. *J. Virol.* **2001**, 75, 3095-3104.

-Huang S. S.; Zheng R. L. *Cancer Lett.* **2006**, 239, 271-280.

I

- International Conference on Harmonisation: *Guideline for Validation of analytical procedures: text and methodology*, noviembre, 2005.

L

- Lau, C.H.; Chua, L.S.; Lee, C.T.; Aziz, R. *J. Eng. Sci. Tec.* **2015**, 10, 104-112.

-Lee J.; Kim Y. S.; Park D. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 74, 960-968.

- Liu T.; Sui X.; Zhang R.; Yang L.; Zu Y. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 8480-8489.

- Liu Y.; Wan Y.; Zhao Z.; Chen H.; *Chem. Cent. J.* **2013**, 7, 1-11.

M

- Mauri, A.; Lobat, M.; Herráez R. *Laboratorio de análisis instrumental*; Reverté: Barcelona, 2010, pp 213-215.

- Moghaddam M.; Mehdizadeh L.; *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, 63, 535-540.

N

- Natsume M.; Muto Y.; Fukuda K.; Tokunaga T.; Osakabe N. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86, 897-901.

O

- Oliveira G.; Oliveira A.; Conceicao E. C.; Leles M. *Food Chem.* **2016**, *211*, 465-473.
- Ondrejovic M.; Maliar T.; Bencovikova H.; Kubincova J. *Nova Biotechnologica et Chimica* **2012**, *11(1)*, 63-71.
- Öztürk N.; Tunçel M.; Uysal U. D. *Food Anal. Methods* **2011**, *4*, 300-306.

P

- Peev G.; Penchev P.; Peshev D.; Angelov G.; Nishiwaki H. *Chem. Eng. Res. Des.* **2011**, *89*, 2236-2243.
- Petersen M.; Simmonds M. S. J. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 121-125.

S

- Santhiago M.; Peralta R. A.; Ademir N.; Mick A. G.; Viera I. C. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *613*, 91-97.
- Shan P. P.; D'Mello P. M. *Nat. Prod. Rad.* **2004**, *3*, 214-221.
- Stehfest K.; Boese M. K.; Kerns G.; Piry A.; Wilhelm C. *J. Plant Physiol.* **2004**, *161*, 151-156.
- Swarup V.; Ghosh J.; Ghosh S.; Saxena A.; Basu A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3367-3370.

T

- Tang W.; Sun B.; Zhao Y. *J. Chromatogr. A* **2014**, *947-948*, 41-48.
- Trute A.; Nahrstedt A. *Phytochemical Analysis* **1996**, *7*, 204-208.

U

- Unger K. K.; Ditz, R.; Machtejevas, E.; Skudas, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2300-2312.

W

- Wang H.; Provan J. G.; Helliwell K. *Food Chem.* **2004**, *87*, 307-311.

Y

- Yuan J.; Chen H.; Feng C. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2651-2654.

Z

- Zibetti A. W.; Aydi A.; Livia M. A.; Bolzan A.; Barth Danielle J. *Supercrit. Fluid.* **2013**, *83*, 133-145.

- Zhu F.; Asada T.; Sato A.; Koi Y.; Nishiwaki H.; Tamura H. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 885-892.