

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



CUANTIFICACIÓN DE ALOÍNA POR EL MÉTODO HPLC EN BEBIDAS DE *Aloe vera*
TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DIPLOMADO DE ESPECIALIZACIÓN

PRESENTADO POR

JOSUÉ ROLANDO FIGUEROA TEREZÓN

MORENA GUADALUPE FLORES PORTILLO

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN QUÍMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MsD. NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORA

LICENCIADA KATIA EUNICE LEYTON BARRIENTOS

ASESORA DE ÁREA EN SALUD PÚBLICA

MÁSTER NURIAN LISSETH PÉREZ DE MARÍN

TUTORA

MAESTRA MARÍA DEL CARMEN POLÍO MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por iluminarme en todo este trayecto de estudio. A mis dos hijos Daniel Arístides Zelaya Flores (Q.E.P.D) y Javier Antonio Durán Flores quienes han sido mi inspiración.

A mis Padres Santiago Arístides Flores Hernández (Q.E.P.D) y Alba Luz Portillo de Flores (Q.E.P.D). A mis compañeros y amigos que siempre me apoyaron en todas las facetas de mi carrera.

Morena Guadalupe Flores Portillo

Gracias a Dios por brindarme la capacidad de llegar hasta este punto de mi vida, por cuidarme en cada etapa de este proceso y por poner a cada una de las personas que me ayudó para ser profesional.

Reitero mi agradecimiento a Dios por brindarme una excelente madre, a la cual estoy eternamente agradecido por el apoyo incondicional y a cada consejo que me brindó para formar al hombre que soy hoy en día, además de inculcarme la pasión a esta carrera tan bonita que es la química y farmacia.

A todos los maestros de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y a nuestra tutora M.Sc. María del Carmen Polío por su dedicación, paciencia y apoyo al compartir sus valiosos conocimientos de la carrera de química y farmacia.

Cada una de las personas que me ayudó en cada etapa de mi carrera, en mi crecimiento personal y profesional, a los que están y a los que no, a toda mi familia que me apoyó con cada consejo; a mis amigos y compañeros por motivarme y seguir adelante.

Estoy eternamente agradecido...

Josué Rolando Terezón

ÍNDICE GENERAL

Pág. N°

ABREVIATURAS

RESUMEN

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN	12
-------------------------	-----------

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS	14
----------------------	-----------

2.1 Objetivo General	14
----------------------	----

2.2 Objetivos Específicos	14
---------------------------	----

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO	16
--------------------------	-----------

3.1 Generalidades.	16
--------------------	----

3.1.1 Antecedentes Históricos	17
-------------------------------	----

3.2 <i>Aloe vera</i>	18
----------------------	----

3.2.1 Definición.	18
-------------------	----

3.2.2 Composición Química de la Sábila	18
--	----

3.2.2.1 Polisacáridos	18
-----------------------	----

3.2.2.2 Cromonas	19
------------------	----

3.2.2.3 Antraquinonas	20
-----------------------	----

3.3 Aloína	20
------------	----

3.3.1 Definición	20
------------------	----

3.3.2 Características Fisicoquímicas de la Aloína	20
---	----

3.4 Descripción de las bebidas a base de <i>Aloe vera</i>	21
3.4.1 Composición de las Bebidas a Base de <i>Aloe vera</i>	21
3.4.2 Marcas de Bebidas de <i>Aloe vera</i> Comercializadas en El Salvador	22
3.5 Cromatografía líquida de alto desempeño	23
3.5.1 Definición	23
3.5.2 Partes del Equipo HPLC	24
3.5.3 Elución	27
3.5.3.1 Elución Isocrática	27
3.5.3.2 Elución en Gradiente	28
3.5.4 Procedimiento General de Uso de un HPLC.	28
3.5.4.1 Preparación del Sistema de HPLC	28
3.5.4.2 Lavado del Sistema Cromatográfico.	29
CAPÍTULO IV	
4.0 PRODUCTO FINAL	32
CAPÍTULO V	
5.0 CONCLUSIONES	46
CAPÍTULO VI	
6.0 RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Composición química de la sábila <i>Aloe vera</i> .	19
2	Marcas comerciales de bebidas de <i>Aloe vera</i> .	23
3	Marcas comerciales de bebidas de <i>Aloe vera</i> en El Salvador	36
4	Ejemplo de tabla para registro de resultados para elaboración de curva de calibración	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°	
1	Reglamento (UE) 2021/468, prohibición del uso en alimentos de ciertas especies botánicas que contienen derivados hidroxiantracénicos.

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Diferentes productos que contienen <i>Aloe vera</i> .	16
2	Estructura de la molécula de Aloína.	20
3	Estructura de la molécula de Aloína A (izquierda) y Aloína B (derecha).	21
4	Bebidas de <i>Aloe vera</i> comercializadas en El Salvador.	22
5	Partes de un HPLC.	24
6	Efecto de la temperatura de la columna en la separación de compuestos.	25
7	Columna estándar y columna de guarda para HPLC.	26
8	Cromatograma (absorbancia versus tiempo de retención).	27
9	Partes de un HPLC.	35
10	Proceso de Filtración de soluciones estándares y muestras a través de membrana nylon 0.45 μm .	40
11	Ejemplo de una curva de calibración de Aloína.	41
12	Cromatograma de Aloína.	42

ABREVIATURAS

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High-Performance Liquid Chromatography).

HAD: Derivados hidroxiantracénicos.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

RMe₂SiCl: compuesto organosilicio donde R es una cadena de alcano, tal como C₁₈H₃₂.

USP: Farmacopea de Estados Unidos (United States Pharmacopeia).

RESUMEN

El presente trabajo se enfoca en el desarrollo de una metodología analítica para determinar Aloína en bebidas de *Aloe vera*, en virtud del aumento en su consumo y de la escasa información sobre la presencia de dicha sustancia en este tipo de productos. Además, de la falta de un marco regulatorio nacional que establezca vigilancia sanitaria periódica

Es importante mencionar que, la presencia de metabolitos secundarios le confiere propiedades medicinales al *Aloe vera*; sin embargo, en el caso específico de la antraquinona aloína, puede provocar efectos laxantes y riesgo de cáncer gastrointestinal por ingesta prolongada. Y considerando que una amplia variedad de bebidas son elaboradas a base de *Aloe vera*, resulta necesario realizar las investigaciones en torno a los niveles de concentración en los que podría estar presenta aloína.

Por tanto, se ha tenido a bien proponer una metodología analítica para cuantificar aloína en bebidas de *Aloe vera* mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

La información que se presenta incluye el muestreo y manejo de las muestras, preparación de reactivos, equipos a utilizar, los procesos analíticos específicos, los cálculos necesarios para la presentación de resultados y su interpretación en comparación con los límites establecidos en el Reglamento (UE) 2021/468 sobre la prohibición del uso en alimentos de ciertas especies botánicas que contienen derivados hidroxiantracénicos establecido por la Unión Europea.

Desde luego, la investigación también busca evidenciar la necesidad de incrementar los esfuerzos por parte de las instituciones de educación superior en cuanto a la enseñanza de metodologías analíticas para la determinación de sustancias nocivas para la salud que pueden estar presentes en alimentos de alta demanda. Asimismo, en las instituciones responsables del establecimiento del marco regulatorio respectivo y en las instituciones de salud pública que velarían por su cumplimiento a través de la vigilancia sanitaria.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

El *Aloe vera*, una planta de uso milenario, ha captado la atención de la industria alimentaria debido a sus potenciales beneficios para la salud. Entre sus componentes se encuentra la aloína, la cual es una antraquinona con propiedades medicinales objeto de interés por sus efectos farmacológicos y cuya presencia en bebidas de *Aloe vera* ha suscitado preocupación debido a los posibles efectos adversos al ser consumida. En ese sentido, el desarrollo de métodos analíticos confiables para cuantificar la aloína en estas bebidas es crucial para garantizar la seguridad y calidad.

Considerando que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es reconocida como una metodología precisa utilizada para la cuantificación de sustancias químicas, se ha tenido a bien elaborar una práctica analítica para la cuantificación de aloína en bebidas de *Aloe vera* haciendo uso de dicha metodología.

En dicha práctica, se explica el fundamento de HPLC y se detalla el procedimiento para la preparación de estándares y muestras. Desde luego, se plantean los cálculos a realizar para obtener la concentración de aloína presente en términos de miligramos por litro (partes por millón) de tal manera que pueda compararse los resultados y dictaminar su cumplimiento con respecto a la Normativa de la Unión Europea por el Reglamento (UE) 2021/468, prohibición del uso en alimentos de ciertas especies botánicas que contienen derivados hidroxiantracénicos.

Finalmente, se espera que la propuesta elaborada, alineada con el Reglamento (UE) 2021/468, pueda ser utilizada con fines pedagógicos en las prácticas de laboratorio que involucren análisis cuantitativo de alimentos y como metodología analítica para verificar los niveles de aloína que pudieran contener las bebidas de *Aloe vera*, de esta manera contribuir al establecimiento de marco regulatorio en nuestro país para que se pueda garantizar la seguridad para los consumidores.

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Presentar una marcha analítica para cuantificar el contenido de aloína que se encuentra presente en las bebidas de *Aloe vera* mediante el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Explicar el fundamento de la cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de aloína.

2.2.2 Identificar las marcas de bebidas de *Aloe vera* comercializadas en el mercado nacional en las cuales podría realizarse la cuantificación de aloína por HPLC.

2.2.3 Describir el procedimiento de preparación de muestras y estándares para la cuantificación de aloína.

2.2.4 Plantear los cálculos necesarios para obtener el contenido de aloína en miligramo por litro.

2.2.5 Indicar la cantidad de aloína permitida en las bebidas de *Aloe vera* según el reglamento de la Unión Europea 2021/468, que será utilizado para la interpretación de resultados.

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades.¹

Una parte de la población de América Latina utiliza productos derivados del *Aloe vera* tales como: geles, cremas corporales y otros cosméticos; también consumen ciertos yogures y jugos de reciente aparición en el mercado (Figura N° 1), sin considerar que el consumo excesivo de estos productos podría ser perjudicial para la salud. Estos productos alcanzaron un valor de ganancia de USD 59,08 millones en 2023. Se prevé que el mercado crecerá a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de 4,60% durante 2024-2032, para alcanzar un valor de USD 88,56 millones en 2032.



Figura N° 1. Diferentes productos que contienen *Aloe vera*.²⁴

Las personas que consumen este tipo de bebidas suelen asociarlas con un estilo de vida saludable, debido a sus propiedades terapéuticas, se utiliza en diversas industrias, incluida la cosmética, alimenticia y bebidas, y productos farmacéuticos. Además, se usa para tratar heridas y diversas afecciones de la piel en el hogar. También ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la psoriasis, los niveles de azúcar, la disminución de LDL y el aumento de HDL.

En la industria cosmética, la planta ofrece varias aplicaciones en productos orgánicos y herbales. El producto es un ingrediente esencial en tónicos para el cabello, mascarillas para el cabello, delineadores, acondicionadores, bloqueadores solares, champús, etc.

En la industria de alimentos y bebidas están lanzando productos que contienen *Aloe vera* como té, jugos, bebidas con sabor, bebidas instantáneas en polvo, y otros.

3.1.1 Antecedentes Históricos

Los primeros escritos conocidos sobre el jugo nutritivo de la planta se remontan a 6.000 años en el antiguo Egipto. El *Aloe vera* era considerada una planta sagrada cuya «sangre» contenía los secretos de la belleza, la salud y la inmortalidad. Era conocida como la «planta de la eternidad». Su efecto antiinflamatorio y calmante del dolor se documentó en el «papiro Eber» de 1,550 a. de C.²

Para su beneficio, los romanos siguieron la sabiduría de los egipcios y griegos al usar también la planta. Durante el reinado del emperador Nerón, alrededor del 50 a. C el médico y naturalista Dioscórides la describe como una de sus plantas curativas favoritas. Recomendaba su jugo para numerosos trastornos físicos, como el tratamiento de heridas, molestias gastrointestinales, gingivitis, artralgia, irritación de la piel, quemaduras solares, acné, pérdida de cabello, etc.²

En la cultura china, el aloe ha sido un ingrediente importante en los tratamientos médicos desde los tiempos de las expediciones de Marco Polo, y se sabía que Cristóbal Colón tenía *Aloe vera* en macetas en su armada de barcos y la usaba para curar las heridas de sus mercenarios.²

Durante el siglo XVI, los monjes jesuitas españoles recolectaron el *Aloe vera* silvestre y lo esparcieron en áreas donde aún no se había cultivado. Los indios mayas bautizaron el jugo de esta planta del desierto como la «Fuente de la Juventud» y también la usaron como repelente de insectos sobre madera y otros materiales vulnerables que a daños por insectos.²

La aloína es un componente de la sábila y se le han atribuido efectos benéficos debido a que tiene capacidad antioxidante. Sin embargo, se ha propuesto que los productos alimenticios a base de sábila no deben contener aloína dado sus propiedades laxantes y alergénicas.³

El Headquartered at the National Institute of Environmental Health Sciences (NIHHS) en 2011 estableció que, en la elaboración de productos a base de sábila, el límite permitido de aloína es menor a 1 ppm para productos líquidos y hasta 10 ppm en productos sólidos o semisólidos. En mayo de 2002, la FDA definió a la aloína como un alimento NO GRAS (no aditivo) y los productos que contienen aloína ya no son viables para medicamentos o suplementos de venta libre.³

En la actualidad, pese a que el aloe continúa sin suficiente aval entre la comunidad médica internacional, son muchas las investigaciones tendentes a descubrir los beneficios de su uso en afecciones terminales como el cáncer o el SIDA.⁴

Así, la Agencia del Gobierno Federal de los Estados Unidos responsable de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha autorizado el uso de productos elaborados con los principios activos aislados de la sábila para tratamientos contra el VIH, e investigaciones de los Laboratorios Carrington de Irving (EE UU) demuestran una mejoría entre los enfermos de SIDA cuya alimentación se reforzó con jugo de *Aloe vera*. Igualmente, científicos de la Universidad de Texas han puesto de relieve que los polisacáridos del *Aloe* son potentes agentes anticancerígenos.⁴

3.2 *Aloe vera*

3.2.1 Definición.⁵

El *Aloe vera* pertenece a una familia de más de 200 especies llamado Aloeneae de la familia Liliaceae originaria de África pero que crecen en Europa y América, ya sea por dispersión natural, o bien porque fueron introducidos por sus múltiples ventajas y actualmente están siendo objeto de cultivo comercial. Del género *Aloe* se han descrito aproximadamente 320 especies, entre las cuales destaca la sábila motivo de nuestro estudio.

Las plantas de esta especie son herbáceas de tallo corto, viváceas, perennes, con aspecto rosetado (rosetas basales), sus hojas son carnosas y lanceoladas y su color varía de gris a verde claro, que presenta manchas rojizas por la exposición prolongada al sol. En su etapa adulta llegan a medir de 65 a 80 cm. de altura.

3.2.2 Composición Química de la Sábila

La sábila contiene principalmente antraquinonas, carbohidratos en su mayoría polisacáridos y cromonas; además de otros componentes que se encuentran en su menor cantidad (tabla 1).⁶

3.2.2.1 Polisacáridos

La sábila es una fuente rica en polisacáridos que forman parte de la fibra soluble, estos se encuentran en mayor proporción en el gel; el glucomanano es uno de los principales polisacáridos.⁷

El glucomanano es un polímero formado por la unión de glucosas y manosas en una proporción 5:8 con enlaces β (1-4) y un alto peso molecular: posee la capacidad de captar agua, formando soluciones muy viscosas.⁷

Tabla 1 Composición química de la sábila *Aloe vera*.⁶

Componente	Elementos
Antraquinonas	Aloe-emodin, ácido aloético, antranol, aloína A (barbaloína) y B (isobarbaloína), emodina, éster de ácido cinámico.
Carbohidratos	Manano, manano acetilado, glucomanano, glucogalactomanano, galactano, galactogalacturano, arabinogalactano, galactoglucoarabinomanano, pectina, xilano y celulosa.
Compuestos inorgánicos	Calcio, cloro, cromo, cobre hierro, magnesio, manganeso, potasio, fósforo, sodio, zinc.
Cromonas	8-C-glucosil-(2'-O-cinnamoil)-7-O-metilaloediol A, 8-C-glucosil-(S)-aloesol, 8-C-glucosil-7-O-metil-(S)-aloesol, 8-C-glucosil-7-O-metilaloediol, 8-C-glucosil-noreugenin, isoaloesin D, isorabaicroma, neoaloesin A.
Enzimas	Fosfatasa alcalina, amilasa, carboxipeptidasa, catalasa, ciclooxidasa, ciclooxigenasa, lipasa, oxidase, fosfoenolpiruvato carboxilasa y superóxido dismutasa.
Varios	Ácido araquidónico, ácido γ -linolénico esteroides, triglicéridos, triterpenoides, ligninas, sorbato de potasio, ácido salicílico y ácido úrico.
Vitaminas	B1, B2, B6, C. β -caroteno, colina, ácido fólico y α -tocoferol.

3.2.2.2 Cromonas

La principal cromona encontrada en la sábila es la aloesina. Las cromonas son componentes bioactivos que ha demostrado tener efecto antidiabético debido a su poder antioxidante, esto puede contribuir a la disminución de los efectos del estrés oxidativo durante la diabetes.⁷

3.2.2.3 Antraquinonas

Las antraquinonas son metabolitos que se componen de anillos aromáticos con dos grupos acetona. En la sábila se encuentran las siguientes antraquinonas: aloe emodina y en mayor cantidad la aloína.⁷

3.3 Aloína

3.3.1 Definición

La aloína es un compuesto amargo y amarillento aislado de la planta de aloe. Es usado como estimulante y laxante, así como para tratar el estreñimiento, mediante movimientos inductores de la defecación. El compuesto se presenta en el látex del aloe amarillo que exuda debajo de la superficie de las hojas de la planta, y no se encuentra en el gel comúnmente usado para tratar eventos dermatológicos. La fórmula molecular es $C_{21}H_{22}O_9$ como se muestra en la Figura N° 2.⁸

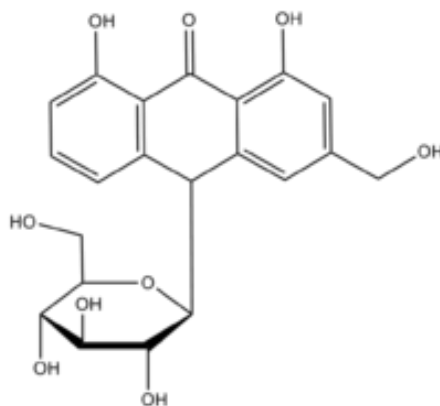


Figura N° 2: Estructura de la molécula de Aloína.⁹

3.3.2 Características Fisicoquímicas de la Aloína

La aloína (10-C-βglucopiranosido de aloe-emodin-antrona) es un polvo microcristalino de color amarillo limón a amarillo oscuro, con olor a áloe y sabor amargo. Es un catártico perteneciente al grupo de las antraquinonas. Tiene una masa molecular de 418,39 g/mol y su fórmula molecular es $C_{21}H_{22}O_9$.⁹

Es un metabolito considerado como un C-heterósido, producto de la combinación de una antraquinona simple (genina) con un azúcar (glucosa) y se extrae de fuentes naturales como una mezcla de dos diastereoisómeros, llamados aloína-A (también conocida como barbaloína) y aloína-

B (o isobarbaloina). En la Figura N° 3 se puede visualizar la diferente orientación del átomo hidrogeno con respecto a la posición 10 del átomo de carbono, ambas estructuras tienen propiedades químicas similares; su estructura molecular es idéntica lo que le confiere un comportamiento similar en una gran variedad de métodos analíticos, como ejemplo en espectroscopia UV-VIS, ambas se detectan casi a la misma longitud de onda.¹⁰

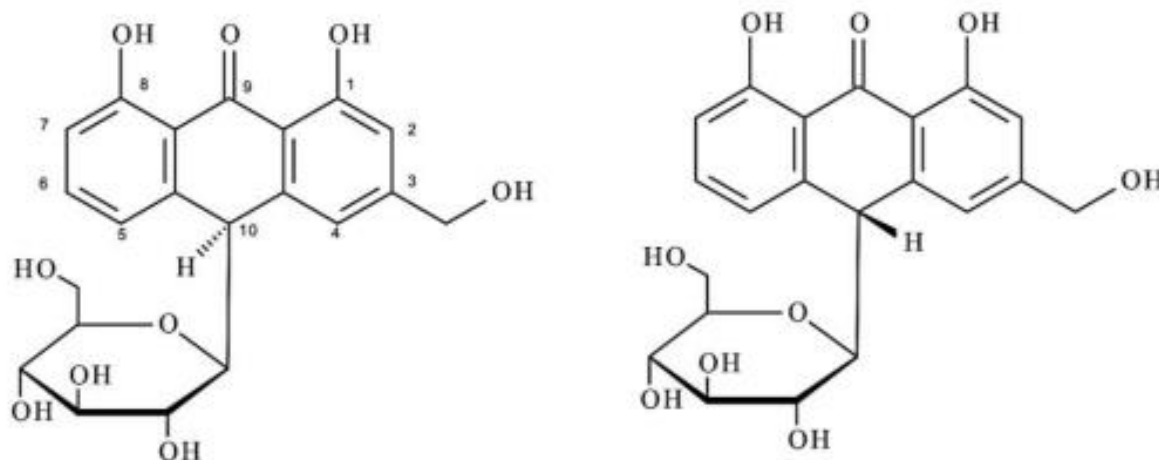


Figura N° 3. Estructura de la molécula de Aloína A (izquierda) y Aloína B (derecha).³³

3.4 Descripción de las bebidas a base de *Aloe vera*

Las Bebidas a base de *Aloe vera* son bebidas analcohólicas, desgasificadas que fueron diseñadas para un beneficio para la salud, para refrescarse en días calurosos o para acompañar las comidas a cualquier hora del día. Las bebidas *Aloe vera* contiene propiedades hidratantes que favorecen la piel y mantienen el cuerpo funcionando óptimamente.¹¹

Pero existe un gran problema ya que en la medida que se consume muy a menudo y a altas cantidades, llegan a provocar calambres a nivel abdominal, diarrea, deshidratación por exceso de excreción e irritación. Estos efectos secundarios fueron estudiados durante dos años en el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos. Se descubrió que cuando las ratas bebían este jugo aumentaba la actividad cancerígena, tanto en las hembras como en los machos.¹²

3.4.1 Composición de las Bebidas a Base de *Aloe vera*

Las bebidas a base de *Aloe vera* contienen los siguientes componentes:

- Agua
- Jugo de *Aloe vera*
- Fructosa
- Azúcar
- Lactato de calcio (estabilizador)
- Goma de gellan (estabilizador)
- Ácido cítrico (regulador de acidez)
- Citrato de sodio (regulador de acidez)
- Saborizantes
- Sucralosa (Edulcorante)

Además de contener 75 componentes activos en el jugo de *Aloe vera*, incluyendo vitamina C, E y A, B12, colina, ácido fólico y más. Algunas marcas pueden contener minerales y antioxidantes que promueven el bienestar en la mente y el cuerpo.¹¹

3.4.2 Marcas de Bebidas de *Aloe vera* Comercializadas en El Salvador

Las marcas y presentaciones de las bebidas a base de *Aloe vera* que se comercializan en tiendas, supermercados y centros comerciales en El Salvador son las siguientes (Figura N° 4)¹³.



Figura N° 4. Bebidas de *Aloe vera* comercializadas en El Salvador.²⁷

Tabla 2. Marcas comerciales de bebidas de *Aloe vera*

Marca	Presentaciones	Sabores
OKF	0.5 L, 1.5L y 2.0L	Original con azúcar, fresa, kiwi, uva, original sin azúcar, piña, mango, lychee, granada, sandia
Del monte	240mL (lata), 0.5L, 1.5L	Original con azúcar, original sin azúcar, granadina
Selectos	0.5 L, 1.5L	Original con azúcar
Cooper	0.5L	Original, Coco
Bio	0.5L	Original
Alovi	0.5 L	Original
Divi <i>Aloe vera</i>	0.5 L	Original
Omnilife aloe beta piña	0.9 L	Original con sabor piña
Savia	0.48 L	Original, piña, mango, fresa
GNC	1 L	Original

Fuente: Elaboración propia con base en ¹³

3.5 Cromatografía líquida de alto desempeño

3.5.1 Definición

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria y una fase móvil.¹⁵

El término cromatografía designa varias técnicas similares que permiten separar diferentes especies moleculares de una mezcla. Las aplicaciones de la cromatografía son numerosas, y pueden estar relacionadas con prácticas de laboratorio o industriales. La cromatografía analítica utiliza una separación cromatográfica del compuesto de una muestra y para la identificación y/o medida de estos compuestos utiliza una detección específica. Las especies moleculares de la muestra se indican como analitos y matriz.¹⁶

Los analitos son las especies moleculares de interés y la matriz forman el resto de componentes de la muestra los componentes se introducen en una fase móvil fluyente que pasa por una fase estacionaria. La fase estacionaria retiene las diferentes especies moleculares que pasan, más fuertes o más débiles, y las libera por separado en la fase móvil. cuando la fase móvil es un gas, la cromatografía se indica como cromatografía de gases (GC) y cuando es un líquido se indica como cromatografía líquida (LC).¹⁶

3.5.2 Partes del Equipo HPLC

Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento opera generalmente con cinco componentes: reservorio (Fase móvil), bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador (Figura N° 5).¹⁷

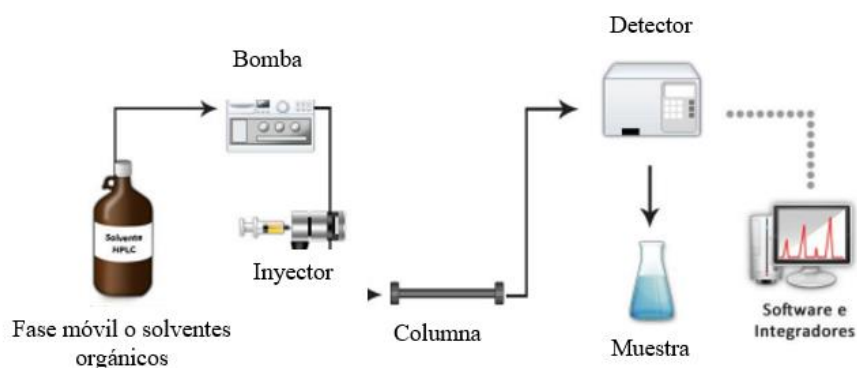


Figura N° 5. Partes de un HPLC.¹⁷

En el reservorio se encuentra la fase móvil. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; pueden requerirse uno o más, dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración.¹⁷

En cuanto a la fase móvil, ésta consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Puede ser una mezcla de agua y acetonitrilo o agua y metanol. En general, la elección de la fase móvil depende de los compuestos a separar y en las condiciones de la separación requerida.¹⁷

La bomba se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado. Se inyecta usualmente un volumen que varía entre 5 μ L y 5 mL.¹⁷

El inyector puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados.¹⁷

El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma. Durante mucho tiempo no se tuvo en cuenta la influencia de la temperatura en la calidad de la separación. Ahora, los instrumentos de HPLC están equipados con columnas (y, por tanto, eluyentes) cuya temperatura se controla termostáticamente. Esto mejora la reproducibilidad de los análisis y ofrece otro parámetro de separación para tener en cuenta (Figura N° 6).¹⁸

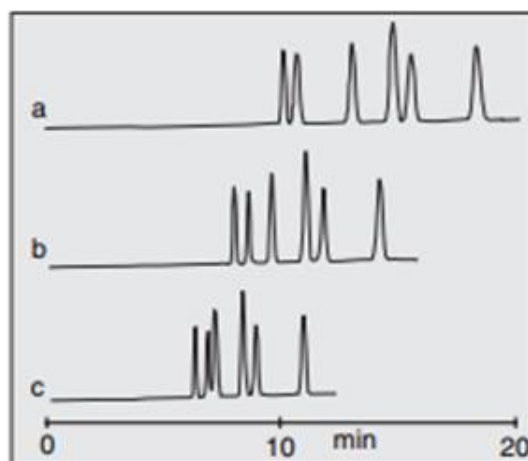


Figura N° 6. Efecto de la temperatura de la columna en la separación de compuestos.¹⁸

Por otro lado, la columna está fabricada generalmente de acero inoxidable, tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria cuyo tamaño de partícula está entre 3 a 10 μm . La fase estacionaria se mantiene en la columna entre dos discos porosos situados en cada uno de los extremos (Figura N° 7). El diámetro interno de la columna, durante mucho tiempo normalizado en 4,6 mm (que requiere un caudal de fase móvil de entre 0,5 y 2 mL/min) es ahora a menudo más estrecho. Las variaciones de estas dimensiones y materiales determinan la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna.¹⁸

Para prolongar la vida útil de la columna, ésta suele ir precedida de una precolumna o guarda columna, corta (de 0,4 a 1 cm), y empaquetada con la misma fase estacionaria que la columna analítica. Esta precolumna, que retiene los compuestos de factor de retención cero ($R_f = 0$), se

cambia periódicamente. También se recomienda, antes del análisis pasar las soluciones de las muestras por un filtro de tamaño de poro inferior a $0.5 \mu\text{m}$.¹⁸

Una guarda columna puede usarse siempre que se cumplan los siguientes requisitos: (a) la longitud de la guarda columna debe ser no mayor de 15% de la longitud de la columna analítica, (b) el diámetro interno debe ser igual o menor que el de la columna analítica y (c) el material de relleno debe ser el mismo que en la columna analítica (p.ej., sílice) y contener la misma fase ligada (por ejemplo, C18). En todo caso se deben cumplir los requisitos de aptitud del sistema especificados en el procedimiento oficial con la guarda columna instalada.¹⁹

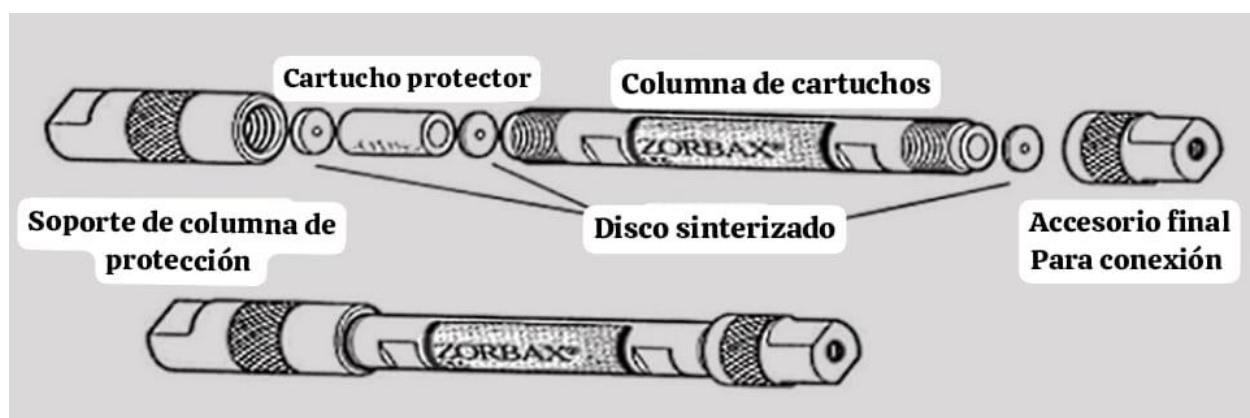


Figura N° 7. Columna estándar y columna de guarda para HPLC.¹⁸

Las fases estacionarias más comúnmente usadas son las de sílice modificada o las microperlas de polímero. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria usada. Las microperlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga.¹⁹

El detector, ubicado al final de la columna, es el encargado de captar los cambios en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por el registrador. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos: selectivos, como los detectores de fluorescencia, que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la mezcla (solo los que cuenten con dicha propiedad serán detectados), y universales, que miden una propiedad física específica del eluyente (fase móvil).¹⁷

Finalmente, el registrador recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma (Figura N° 8) para su posterior lectura e interpretación.¹⁷

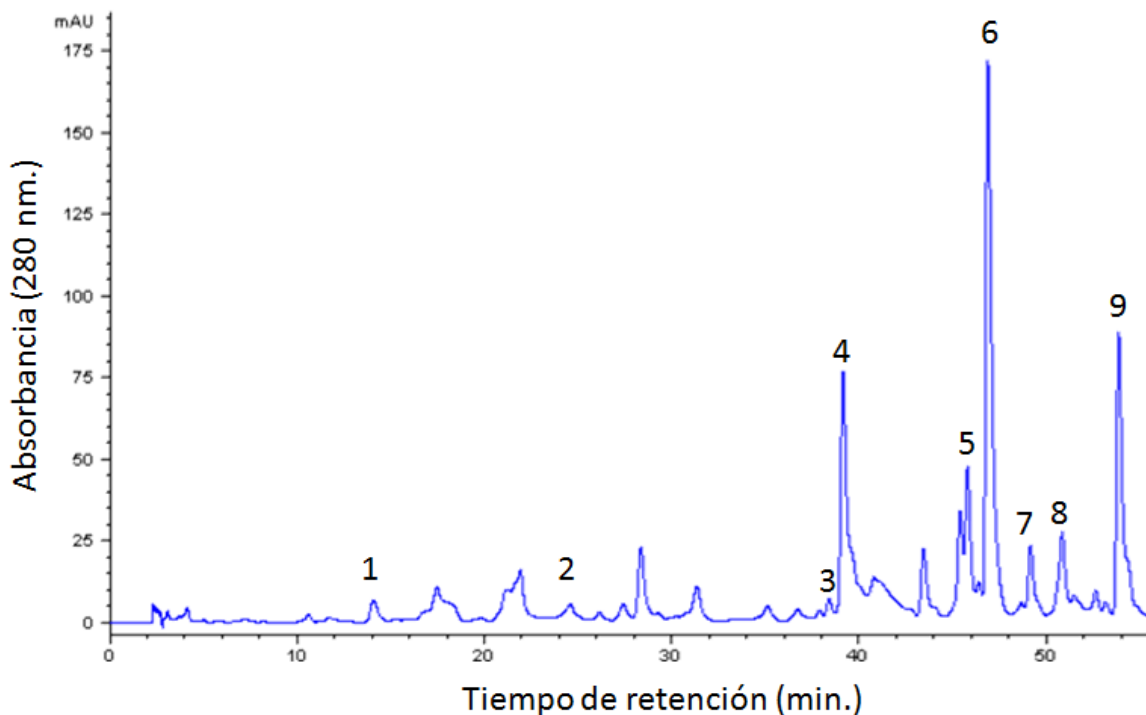


Figura N° 8. Cromatograma (absorbancia versus tiempo de retención)²⁸

3.5.3 Elución

3.5.3.1 Elución Isocrática.²⁰

En una separación isocrática, el eluyente débil y el fuerte se mantienen en una proporción invariable por unidad de tiempo. El analista puede preparar el eluyente isocrático fuera de línea o mezclarlo en línea con una bomba de HPLC capaz de dosificar los diferentes eluyentes a una velocidad predeterminada constante. Este modo de elución es cómodo, uniforme y robusto porque las influencias del tiempo de retención provocadas por el volumen de permanencia son insignificantes cuando se transfiere un método entre sistemas.

La elución isocrática tiene inconvenientes y puede no ser adecuada para todas las separaciones. Hay problemas inherentes que incluyen una resolución deficiente de los picos de elución temprana, una disminución de la simetría debido a picos con cola, una disminución de la sensibilidad debido al ensanchamiento de banda y problemas de contaminación de la columna debido a la acumulación de compuestos fuertemente retenidos.

3.5.3.2 Elución en Gradiente.²⁰

Las separaciones en gradiente en fase reversa o intercambio iónico suelen implicar la mezcla en línea de la fase móvil para lograr un aumento constante del eluyente orgánico a lo largo del análisis. Al comienzo del gradiente, cuando la concentración del eluyente es baja, el analito se divide en la fase estacionaria o permanece en la cabeza de la columna. A medida que aumenta la concentración del eluyente, el analito se transfiere a la fase móvil, se mueve por la columna y, finalmente, se eluye.

La elución en gradiente proporciona la capacidad de separar analitos con un amplio intervalo de hidrofobicidad en un período de tiempo razonable. Las ventajas adicionales pueden incluir una mejor resolución de los picos y una mayor sensibilidad debido a una mayor altura de los picos. El deterioro de la columna también se reduce cuando los componentes fuertemente retenidos se eliminan de la columna al final del análisis.

También hay desventajas cuando se utiliza la elución en gradiente. Se requiere una mezcla de gradiente en línea constante y sin pulsos, por lo que a menudo se necesita una costosa instrumentación como bomba. Además, puede producirse precipitación cuando algunas fases móviles se mezclan en determinadas combinaciones. Los tiempos de análisis pueden ser largos debido al reequilibrado posterior al gradiente, y el tiempo de permanencia (V_d) de los instrumentos puede variar, lo que causa problemas de transferencia de métodos, sin una compensación adecuada.

Se denomina elución en gradiente o programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente a la composición del disolvente durante la cromatografía. El perfil de elución en gradiente se presenta en la monografía individual como una tabla de gradientes, que se indica el tiempo y la composición proporcional de la fase móvil en el tiempo indicado.

3.5.4 Procedimiento General de Uso de un HPLC.³¹

3.5.4.1 Preparación del Sistema de HPLC

- Encender la computadora
- Encender los módulos del HPLC
- Inicializar el programa que controla los módulos del HPLC

- Purgar la fase móvil preparada para evitar la presencia de burbujas que puedan ingresar al sistema de Cromatografía; esto se realiza configurando primero la bomba a un flujo de 5 mL/min y luego abriendo manualmente la perilla de purga.
- Permitir que la fase móvil corra al flujo programado por 5 minutos (la presión de la bomba en este paso debe ser en el intervalo de 0 a 1 Bar)
- Después de transcurrido el tiempo se apaga la bomba desde la terminal de computadora y se cierra la perilla de purga de la bomba manualmente hasta que quede ajustada.
- Programar la bomba, el detector, el auto inyector y el horno con los parámetros especificados en el método.
- Activar todos los módulos del equipo y permitir el funcionamiento de la bomba al flujo de trabajo para que el sistema de Cromatografía se estabilice.

3.5.4.2 Lavado del Sistema Cromatográfico.³¹

- Colocar en el lugar de la fase móvil agua calidad HPLC filtrada a través de poro de 0.45 μm y desgasificada, lavando el filtro de entrada de la fase móvil con agua HPLC.
- Purgar el sistema abriendo la perilla de purga de la bomba manualmente hasta que quede floja.
- Configurar la bomba a un flujo de 5 ml/min
- Encender la bomba.
- Dejar que corra el agua por 5 minutos.
- Desactivar la bomba
- Cerrar la perilla de purga de la bomba.
- Configurar el flujo de la bomba a 1 ml/min
- Activar la bomba dejando que el agua corra por el sistema durante 30 minutos
- Desactivar la bomba
- Repetir todo el procedimiento anterior usando una mezcla filtrada y desgasificada de Metanol HPLC: agua HPLC (50:50).
- Realizar el último lavado colocando en lugar de la mezcla metanol/agua el reactivo metanol calidad HPLC.
- Al terminar los 90 minutos de lavado se apaga la bomba y los demás componentes del sistema HPLC

- Cerrar el programa del sistema HPLC y el servidor
- Apagar el sistema de cómputo desde el botón de inicio del sistema operativo
- Apagar el UPS manteniendo presionado el botón de encendido.

CAPÍTULO IV

4.0 PRODUCTO FINAL

MARCHA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ALOÍNA EN LAS BEBIDAS A BASE DE *ALOE VERA* POR EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC).

1. Introducción

El *Aloe vera* pertenece a una familia de más de 200 especies llamado Aloeneae de la familia Liliaceae originaria de África pero que crecen en Europa y América, ya sea por dispersión natural, o bien porque fueron introducidos por sus múltiples ventajas y actualmente están siendo objeto de cultivo comercial. Del género *Aloe* se han descrito aproximadamente 320 especies, entre las cuales destaca la sábila (*Aloe vera*).

El *Aloe vera*, una planta de uso milenario, ha captado la atención de la industria alimentaria debido a sus potenciales beneficios para la salud. Entre sus componentes, la aloína, una antraquinona con propiedades medicinales, ha sido objeto de interés por sus efectos farmacológicos.

La aloína es un compuesto amargo y amarillento aislado de la planta de *Aloe vera*. Es usado como estimulante y laxante, así como para tratar el estreñimiento, mediante movimientos inductores de la defecación. El compuesto se presenta en el látex del aloe amarillo que exuda debajo de la superficie de las hojas de la planta, y no se encuentra en el gel comúnmente usado para tratar eventos dermatológicos.

Sin embargo, su presencia en bebidas de *Aloe vera* ha suscitado preocupaciones regulatorias debido a sus posibles efectos adversos. Por tanto, el desarrollo de métodos analíticos confiables para cuantificar la aloína en estas bebidas es crucial para garantizar la seguridad y calidad.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Cuantificar el contenido de aloína que se encuentra presente en las bebidas de *Aloe vera* mediante el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

2.2 objetivos específicos

2.2.1 Comprender el fundamento de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

2.2.2 Realizar la cuantificación de contenido de aloína en bebidas comerciales de *Aloe vera* mediante HPLC

2.2.3 Calcular la concentración de aloína en las bebidas de *Aloe vera* expresada en miligramo por litro (ppm)

2.2.4 Comparar los resultados obtenidos en la práctica con la cantidad de aloína permitida en las bebidas de *Aloe vera* según el Reglamento de la Unión Europea 2021/468.

3. Fundamento

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el tipo de cromatografía por elución más versátil y más utilizado. La técnica es utilizada por científicos para separar y determinar especies en una variedad de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. En este tipo de cromatografía, se combina una fase móvil líquida y una fase estacionaria finamente dividida contenida en una columna. Con el fin de obtener velocidades de flujo satisfactorias, la fase móvil debe ser presurizada a varios cientos o más de libras por pulgada cuadrada.²¹

El éxito de este tipo de cromatografía se debe también a la posibilidad, para actuar de manera muy precisa sobre la selectividad entre compuestos mediante una elección adecuada de columnas y composición de fase móvil en función de las interacciones soluto/fase móvil/fase estacionaria.¹⁸

Los tipos de cromatografía líquida de alta resolución suelen clasificarse con base en su mecanismo de separación o según el tipo de fase estacionaria, y los métodos se pueden escoger con base en la solubilidad y la masa molecular. En muchos casos, los métodos de fase inversa son apropiados para las moléculas pequeñas. En cromatografía inversa, la fase estacionaria es no polar, generalmente un hidrocarburo, y la fase móvil es un disolvente relativamente polar (como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano).²¹

El objeto de la cromatografía rara vez es determinar la composición global de una muestra, sino más bien es medir la concentración de un compuesto que está presente en esa muestra, para lo cual se debe elegir un detector adecuado. Los métodos de detección más utilizados se basan en las propiedades ópticas de los analitos: absorción, fluorescencia e índice de refracción.¹⁸

Para la determinación de Aloína, se utiliza la cromatografía inversa y la detección se basa en la propiedad óptica de absorción de radiación ultravioleta a 295 nm

4. Partes del equipo HPLC

Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento opera generalmente con cinco componentes: reservorio (Fase móvil), bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador (Figura N° 9).¹⁷

En el reservorio se encuentra la fase móvil. Esta fase consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; pueden requerirse uno o más, dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración.¹⁷

La bomba se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado. Se inyecta usualmente un volumen que varía entre 5 μ L y 5 mL.¹⁷

El inyector puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados.¹⁷

El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma.¹⁷

Por otro lado, la columna está fabricada generalmente de acero inoxidable, tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria; además, su tamaño de partícula está entre 3 a 10 μ m. Las variaciones de estas dimensiones y materiales determinan la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna.¹⁷

El detector, ubicado al final de la columna, es el encargado de captar los cambios en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por el registrador. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos: selectivos, como los detectores de fluorescencia, que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la

mezcla (solo los que cuenten con dicha propiedad serán detectados), y universales, que miden una propiedad física específica del eluyente (fase móvil).¹⁷

Finalmente, el registrador recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación.¹⁷

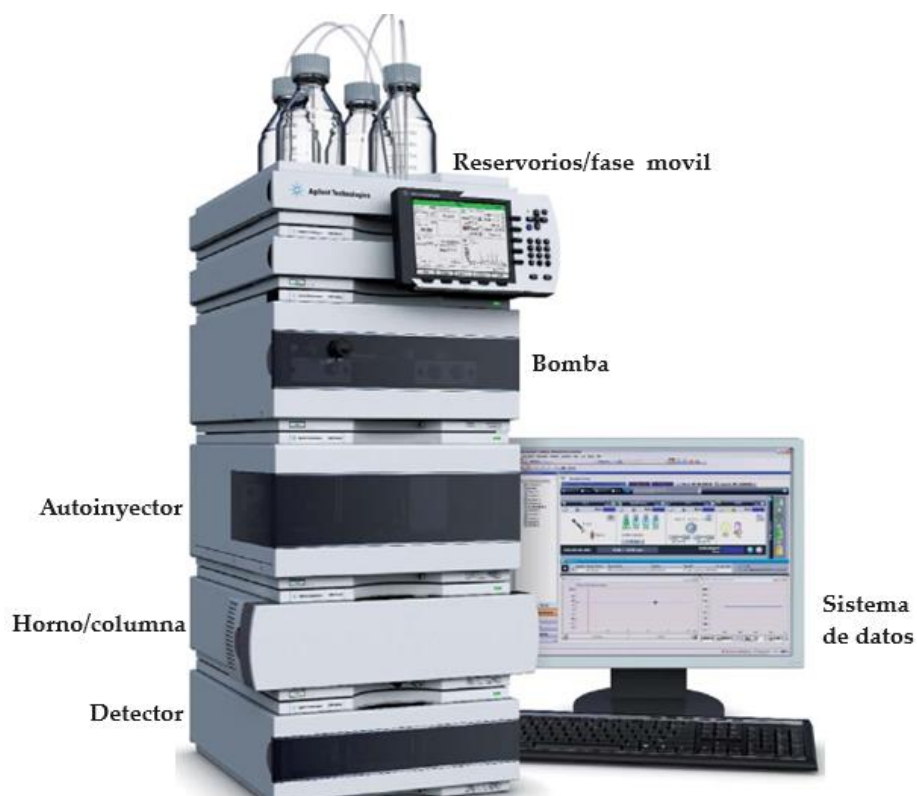


Figura N° 9. Partes de un HPLC.²⁹

5.0 Información general de la muestra

El universo está constituido por todas las marcas comerciales de bebidas de *Aloe vera* que se comercializan en todo el territorio nacional: OKF, Del Monte, Selectos, Omnilife, Savia, GNC, Alovi, Cooper y Bio. (ver **Tabla 3**).

Tabla 3. Marcas comerciales de bebidas de *Aloe vera* en El Salvador

Marca	Presentaciones
OKF	0.5 L, 1.5L y 2.0L
Del monte	240mL (lata), 0.5L, 1.5L
Selectos	0.5 L, 1.5L
Cooper	0.5L
Bio	0.5L
Alovi	0.5 L
Divi <i>Aloe vera</i>	0.5 L
Omnilife aloe beta piña	0.9 L
Savia	0.48 L
GNC	1 L

Fuente: Elaboración propia con base en ¹³

5.1 Tipo de Matriz

La matriz de la muestra está constituida por los siguientes componentes: agua, jugo de *Aloe vera*, fructosa, gel de *Aloe vera*, lactato de calcio, ácido cítrico, citrato trisódico, entre otros dependiendo de la marca.

La longitud de onda a la que suele detectarse con mayor sensibilidad la aloína A y aloína B es a 295 nm, alrededor de esa longitud de onda podrían existir diversas interferencias, algunas de ellas pueden ser otros compuestos con absorción en esa región del espectro, como pigmentos naturales, contaminantes, o productos de degradación.

5.2 Información del Muestreo

El muestreo es Aleatorio simple, se escogerán 3 muestras de cada una de las 10 marcas (triplicado) que se comercializan en el país.

5.3 Almacenamiento de Muestras

Las condiciones de almacenamiento se determinan en función de las características y propiedades de las muestras obtenidas. Las condiciones de almacenamiento deberán garantizar que la muestra no se altere de ningún modo que pueda afectar a los parámetros que se desean analizar.²²

En general, las muestras deberán guardarse en un lugar limpio, seco, oscuro, fresco y suficientemente ventilado. Habrá que controlar con regularidad la temperatura de almacenamiento. La temperatura de estas instalaciones no podrá ser inferior a 0 °C ni superar los 30 °C.²²

La temperatura de conservación para trasladar las bebidas de *Aloe vera* puede variar dependiendo de varios factores, como los ingredientes específicos de la bebida y las instrucciones del fabricante. En general, se recomienda a una temperatura entre 4°C y 25°C. además es importante revisar la etiqueta del producto y seguir las recomendaciones del fabricante para obtener mejores resultados.²²

6.0 Reactivos, materiales y equipo

6.1 Reactivos

- Metanol HPLC
- Agua HPLC
- Aloína 99%

6.2 Materiales y Equipos

La cantidad de materiales y equipos es para el análisis de las 10 marcas de bebidas a base de *Aloe vera* comercializadas en el país, realizándose por triplicado el análisis de cada muestra.

- 6 Balones volumétricos de 100 mL
- 1 micropipetas de volumen de 100-1000 μ l
- 1 micropipetas de volumen de 10-100 μ l
- 30 balones volumétricos de 10 mL
- 2 Probetas de 500 mL
- 35 Filtros de 0,45 μ m y membrana de PVDF, Nylon o equivalente

- 1 Frasco lavador Frasco volumétrico 25.00 mL
- 35 Jeringa de 3.00 mL
- 35 viales de 2.00 mL
- Equipo de filtración al vacío Kimax de 2000.00 mL
- Equipo HPLC con Detector UV-VIS
- Columna: Zorbax SB-C18, 250 mm x 4.6 mm
- Ultrasonido
- Balanza analítica.

7.0 Procedimiento del análisis

7.1 Preparación del Sistema de HPLC.

- Encender la computadora
- Encender el equipo HPLC, 60 minutos antes de cada análisis.
- Inicializar el programa que controla los módulos del HPLC
- Purgar la fase móvil preparada para evitar la presencia de burbujas que puedan ingresar al sistema de Cromatografía; esto se realiza configurando primero la bomba a un flujo de 5 mL/min y luego abriendo manualmente la perilla de purga.
- Permitir que la fase móvil corra al flujo programado por 5 minutos (la presión de la bomba en este paso debe ser en el intervalo de 0 a 1 Bar)
- Después de transcurrido el tiempo se apaga la bomba desde la terminal de computadora y se cierra la perilla de purga de la bomba manualmente hasta que quede ajustada.
- Programar la bomba, el detector, el autoinyector y el horno con los parámetros especificados en el método.
- Activar todos los módulos del equipo y permitir el funcionamiento de la bomba al flujo de trabajo para que el sistema de Cromatografía se estabilice.

7.2 Preparación de la Fase Móvil, Solución Madre y Soluciones Estándar de Aloína A y B y Preparación de las Muestras.

7.2.1 Fase Móvil

Utilizando probetas de nalgene de 500mL, medir 500 mL de agua HPLC y 500mL Metanol HPLC. Transferir a un beakers de 1L, mezclar y filtrar a través de membrana nylon 0.45 μ m. Transferir al reservorio y desgasificar mediante ultrasonido por 5 minutos.

7.2.2 Preparación de la Solución Madre de Aloína A y Aloína B

Pesar 10 mg de estándar de Aloína A en una balanza analítica y también pesar 10 mg de Aloína B en una balanza analítica, transferir ambos estándares a un balón volumétrico de 100 mL, disolver y aforar con metanol HPLC. Se llegará a la concentración de 200 ppm de aloína (aloína A + aloína B). A esta preparación se le conocerá como solución madre.²³

7.2.3 Preparación de las Disoluciones Patrón

A partir de la solución madre de aloína A y B preparada en el punto 7.2.2, medir alícuotas de la solución madre de aloína de 25 μ l, 50 μ l, 250 μ l, 500 μ l y 750 μ l y transferir cada alícuota a respectivos balones volumétricos de 100 mL y aforar con metanol, para obtener las concentraciones 0.05 ppm (25 μ l), 0.1 ppm (50 μ l), 0.5 ppm (250 μ l), 1.0 ppm (500 μ l) y 1.5 ppm (750 μ l) respectivamente. Mezclar y filtrar a través de membrana nylon 45 μ m y colocar en viales de 2 mL.²³

7.2.4 Preparación Muestra.

Homogenizar el contenido de 3 botellas de muestra de 500 ml de cada marca, tomar alícuota de 1 mL de cada una y transferir a respectivos balones volumétricos debidamente rotulados de 10 mL. Aforar con metanol HPLC, mezclar y filtrar a través de membrana nylon 0.45 μ m y colocar en viales de 2 mL (Figura N° 10). Cada análisis de cada muestra se realizará por triplicado.



Figura N° 10: Proceso de Filtración de soluciones estándares y muestras a través de membrana nylon 0.45 μm .³⁰

7.3 Sistema Cromatográfico

El cromatógrafo líquido está equipado con detector a 295 nm y una columna de 4.6 mm x 25 cm que contiene fase estacionaria L1 de 5 μm . El flujo es de aproximadamente 1.0 mL por minuto.

7.3.1 Curva de Calibración

- Inyectar por separado volúmenes iguales (20 μL) de cada solución estándar a concentraciones 0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm y 1.5 ppm por un tiempo de 10 minutos.
- Registrar las respuestas. Tabular de la siguiente forma:

Tabla 4. Ejemplo de tabla para registro de resultados para elaboración de curva de calibración.

N° de estándar	Concentración mg/L (x)	Área (y)
1	0.05	
2	0.1	
3	0.5	
4	1.0	
5	1.5	

Fuente: Elaboración propia.

- Elaborar la curva de calibración graficando en el eje “x”, la concentración de las muestras en partes por millón (PPM) y en el eje “y”, el área leída por el equipo según corresponda a cada estándar, por ejemplo. (Figura N° 11)

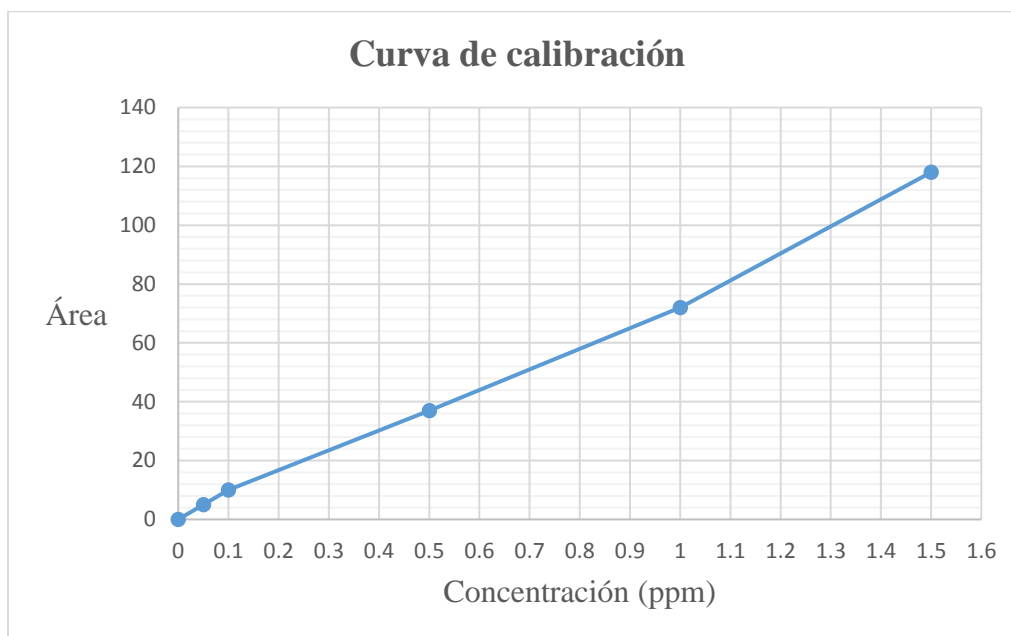


Figura N° 11. Ejemplo de una de Curva de calibración de Aloína.³¹

7.3.2 Cálculos

- A partir de la ley de Lambert-Beer, se tiene que $A = \epsilon bc$ donde la celda fue de 1 cm, relacionando la ecuación de Lambert-Beer con la ecuación de la línea recta; $y = mx + b$ y su coeficiente de determinación R^2 , considerando que³⁵:

$$y = mx + b$$

donde:

- x: concentración de aloína expresada en mg/L
- y: área (variable dependiente)
- m: pendiente es igual producto de la absortividad ϵ .
- b: intercepto

7.3.3 Análisis de la Muestra

Inyectar por separado volúmenes iguales (20 μL) de las preparaciones de cada muestra, en el cromatógrafo.

Registrar las respuestas.

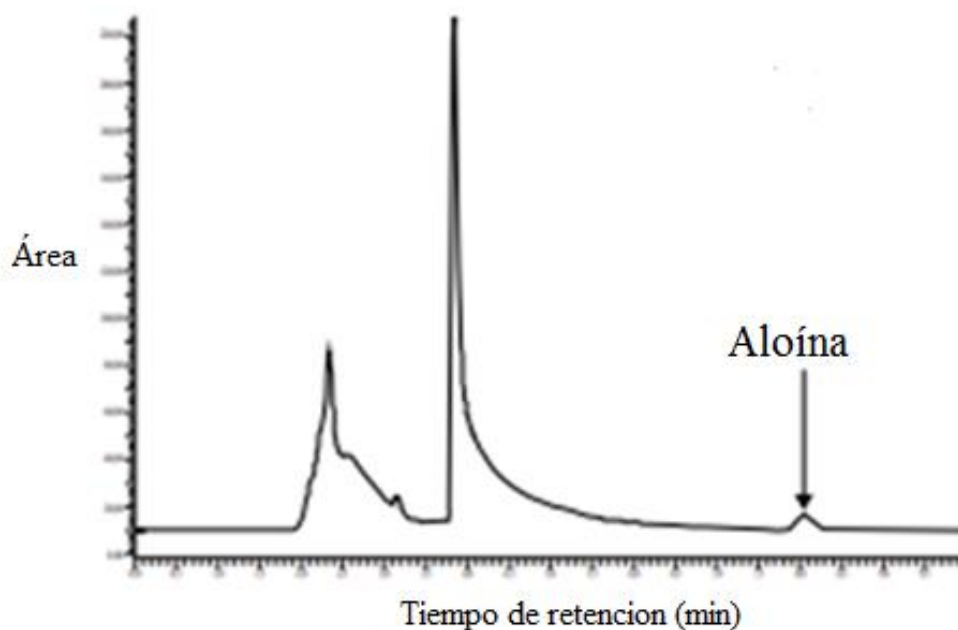


Figura N° 12. Cromatograma de Aloína.³²

La concentración de aloína en la bebida de *Aloe vera*, se calculará relacionando la ley de Lambert-Beer con la ecuación de la línea recta despejando la x de la fórmula de regresión lineal de la siguiente manera³⁵:

$$y = mx + b$$

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$C = \frac{\text{Area} - b}{m} \times 10$$

Donde:

- C: concentración de aloína en la bebida de *Aloe vera* (ppm)
- Área: área de aloína en el cromatograma de la preparación muestra
- b: intercepto de la curva de calibración Área vs concentración aloína
- m: pendiente de la curva de calibración Área vs concentración aloína
- 10: factor de dilución de la muestra.

7.4 Lavado del Sistema Cromatográfico

- Colocar en el lugar de la fase móvil agua calidad HPLC filtrada a través de poro de 0.45 μm y desgasificada, lavando el filtro de entrada de la fase móvil con agua HPLC.
- Purgar el sistema abriendo la perilla de purga de la bomba manualmente hasta que quede floja.
- Configurar la bomba a un flujo de 5 ml/min
- Encender la bomba.
- Dejar que corra el agua por 5 minutos.
- Desactivar la bomba
- Cerrar la perilla de purga de la bomba.
- Configurar el flujo de la bomba a 1 ml/min
- Activar la bomba dejando que el agua corra por el sistema durante 30 minutos
- Desactivar la bomba
- Repetir todo el procedimiento anterior usando una mezcla filtrada y desgasificada de Metanol HPLC: agua HPLC (50:50).
- Realizar el último lavado colocando en lugar de la mezcla metanol/agua el reactivo metanol calidad HPLC.
- Al terminar los 90 minutos de lavado se apaga la bomba y los demás componentes del sistema HPLC
- Cerrar el programa del sistema HPLC y el servidor
- Apagar el sistema de cómputo desde el botón de inicio del sistema operativo
- Apagar el UPS manteniendo presionado el botón de encendido.

8. Normativas Regulatorias

Normativa de la Unión Europea por el Reglamento (UE) 2021/468 de la comisión de 18 de marzo de 2021, por el que se modifica el anexo III del Reglamento (CE) N° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a las especies botánicas que contienen derivados hidroxiantracénicos.

El Comité ha concluido que los productos listos para usar después de su preparación de acuerdo con las instrucciones del fabricante que contengan un nivel analizado superior o igual a 1 ppm de aloe-emodina y/o 1 ppm de emodina y/o 1 ppm de aloína (aloína A + aloína B) proporcionan una clara evidencia de presencia de estas sustancias en los productos y, por lo tanto, son motivo de preocupación para la salud pública. La suma de los contenidos analizados de aloína A y aloína B se puede utilizar para cuantificar el contenido total de HADs en preparaciones de la hoja de las especies de Aloe, ya que la aloína A y B son los HADs más comunes en las especies de Aloe. Deben adoptarse medidas con respecto a estos productos para garantizar un alto nivel de protección de la salud humana.

CAPÍTULO V

5.0 CONCLUSIONES

1. El método Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) es una técnica ampliamente utilizada en análisis debido a su alta sensibilidad, su capacidad para adaptarse a mediciones cuantitativas precisas, su facilidad de automatización y su habilidad para separar compuestos no volátiles o termolábiles; que utiliza una fase estacionaria y una fase móvil líquida para realizar separaciones. Estas separaciones se logran a través de procesos como partición, adsorción o intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comunes son la sílice modificada o las perlas poliméricas. Además, tiene una amplia aplicación en la industria, la ciencia y la sociedad en general, siendo útil para analizar sustancias como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, medicamentos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, compuestos organometálicos y diversas sustancias inorgánicas.
2. El sondeo realizado en los diferentes supermercados y tiendas de conveniencia ha permitido conocer que las marcas de bebidas a base de *Aloe vera* comercializadas en el país son las siguientes: OKF, Del monte, Selectos, Cooper, Bio, Alovi, Divi *Aloe vera*, Omnilife aloe beta pina, Savia y GNC y de las cuales ninguna presentaba en su etiqueta si había presencia o ausencia de aloína en la respectiva bebida.
3. Para la determinación cuantitativa de aloína se propone preparar una solución stock de 200 ppm, a partir de la cual se realicen diluciones para elaborar una curva de calibración. Por otra parte, se plantea que la preparación de la muestra se realice mediante dilución única de una alícuota de bebida de *Aloe vera*. Tanto para las soluciones estándares como las muestras el metanol sería el disolvente a utilizar.
4. Debido a que el método de regresión lineal es una técnica estadística precisa y sencilla que nos ayuda a analizar datos y calcular el valor de datos desconocido optamos por utilizarla para calcular la concentración de aloína en las bebidas a base de *Aloe vera* ya que es un método de cálculo 100% eficaz.
5. Ya que la cantidad máxima de aloína permitido en bebidas a base de *Aloe vera* es de 1 ppm esta es la suma tanto de la aloína A y aloína B, es importante la cuantificación de esta sustancia que puede estar presente en las bebidas elaboradas a base de *Aloe vera*. Ya que si se encuentra en cantidades mayores a 1 ppm es perjudicial para la salud ya que puede provocarnos cáncer,

insuficiencia renal y diarrea por lo que debe ser un motivo de análisis siempre este tipo de bebidas.

CAPÍTULO VI

6.0 RECOMENDACIONES

1. Que la Superintendencia de Regulación Sanitaria (SRS), establezca un marco regulatorio y que verifique y monitoree el contenido presente y rotulado de Aloína en bebidas a base de *Aloe vera* comercializadas en el mercado salvadoreño; y, durante el proceso del levantamiento del marco normativo y a posteriori, se sugiera un límite de consumo para personas con diagnóstico de ulceraciones en cualquier área de tracto gastrointestinal, personas con enfermedad renales o con enfermedades crónicas.
2. A la Superintendencia de Regulación Sanitaria se responsabilice de verificar que todas las bebidas a base de *Aloe vera* que se comercializan en el territorio nacional, tengan impreso en sus envases primario y secundario información sobre el contenido de aloína y el daño a la salud que puede ocasionar el consumo excesivo de una bebida que contenga esta sustancia.
3. A la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, se recomienda que se tome de referencia esta marcha analítica propuesta en este documento para su desarrollo y su posterior validación para que después sea una herramienta para la enseñanza y formación de los estudiantes de la carrera, que cursan asignaturas relacionadas con el análisis instrumental, análisis bromatológico, y salud pública.
4. A la población en general, evitar el consumo excesivo de bebidas de *Aloe vera*, pues aún deben robustecerse las investigaciones enfocadas a determinar los efectos nocivos a la salud de las personas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EMR, A CLAIGHT Enterprise. Mercado Latinoamericano de Aloe Vera – Por Producto (Extracto de Gel de Aloe Vera, Extracto de Hoja Entera, Otros); Por Forma (Concentrados, Geles, Bebidas, Polvos, Cápsulas); Por Industria de uso final (Industria Farmacéutica, Cosmética, Alimentaria); Dinámica del Mercado, Análisis de Precios; Panorama Competitivo; Inversión de Capital, Gastos Operativos [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.informesdeexpertos.com/informes/mercado-latinoamericano-de-aloe-vera>
2. Española L. Breve Historia del Aloe Vera. Breve Historia de los nutrientes. 11 de octubre del 2023; pag #2. Disponible en: <https://lamberts.es/art-dsp/breve-historia-del-aloe-vera/>.
3. IBQ Mayra Paloma A. “EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIDIABÉTICAS DE PRODUCTOS DE SÁBILA (Aloe vera) SOMETIDOS A TRATAMIENTOS DE ELIMINACIÓN DE ALOÍNA” [Internet]. [Querétaro, México]: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO; septiembre del 2015. Disponible en: <https://ring.uaq.mx/bitstream/123456789/805/1/RI003913.pdf>
4. Historia del Aloe Vera [Internet]. Aloveria. [citado el 12 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.aloveria.com/es/content/15-historia>
5. Adriana Elizabeth MZ, Jose Rodrigo OV. Estudio De Factibilidad Para El Cultivo De Sabila (Aloe Vera) En San Luis Potosi [Internet]. [Ciudad de Mexico, Mexico]: Universidad Autonoma de San Luis Potosi; 2006. Disponible en: [https://cicsa.uaslp.mx/bvirtual/tesis/tesis/Estudio_de_la_Factibilidad_para_el_Cultivo_de_S%C3%A1bila_\(ALOE_VERA\)_en_San_Luis_Potosi%20de%20Factibilidad%20para%20la%20Sabila.pdf](https://cicsa.uaslp.mx/bvirtual/tesis/tesis/Estudio_de_la_Factibilidad_para_el_Cultivo_de_S%C3%A1bila_(ALOE_VERA)_en_San_Luis_Potosi%20de%20Factibilidad%20para%20la%20Sabila.pdf).
6. Domínguez-Fernández RN, Arzate-Vázquez I, Chanona-Pérez JJ, Welti-Chanes JS, Alvarado-González JS, Calderón-Domínguez G, et al. El gel de Aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Rev Mex Ing Quim [Internet]. 2012 [citado el 30 de julio de 2024];11(1):23–43. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000100003.
7. Vega G A, Ampuero C N, Díaz N L, Lemus M R. El aloe Vera (aloe barbadensis miller) Como componente DE alimentos funcionales. Rev Chil Nutr [Internet]. 2005 [citado el 30 de julio de 2024];32(3):208–14. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182005000300005.

8. INNOAGRAL pone a punto el análisis de Aloina en Aloe-Vera y productos derivados de éste [Internet]. Laboratorio Innoagral - Análisis agroalimentarios. 28 de abril del 2017 [citado el 12 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.innoagral.com/blog/innoagral-pone-a-punto-el-analisis-de-aloina-en-aloe-vera-y-productos-derivados-de-este/>.
9. Saavedra O, RONDÓN C, Galignani MI, Ayala C, Niccola M. Anthraquinone obtention from Aloe Vera (L.) Burm. f. Exudate [Internet]. Bvsalud.org. [cited 2024 Aug 12]. Available from: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/09/416715/obtencion-de-antraquinona-contenida.pdf>.
10. Molero T, Ettiene G, Vilorio M, editores. Determinación de aloína en poblaciones de Aloe vera L. (= Aloe barbadensis M.) del occidente de Venezuela [Internet]. Vols. 16, n°2. MULTICIENCIAS; 2 de junio del 2016. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/904/90452745004.pdf>
11. Aloe Vera [Internet]. Sula -. 2021 [citado el 30 de julio de 2024]. Disponible en: <https://sula.hn/producto/aloe-vera-pulpa-1500ml>.
12. El grave peligro para tu salud de los zumos de aloe vera [Internet]. CADENA100.ES. 2020 [cited 2024 Aug 12]. Available from: https://www.cadena100.es/el-coach/noticias/peligro-para-salud-los-zumos-aloe-vera-20200624_783062
13. Dirección de Salud Ambiental (minsal), Unidad de Alimentos y Bebidas. Listado de bebidas envasadas no carbonatadas. junio del 2021.
14. Licda. Avelina M, Licda. Olga M. Cromatografía Líquida (HPLC) [Internet]. 2 de diciembre del 2013. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases%201%C3%ADquidos.pdf>
15. Şerban Moldoveanu, David V. Essentials in modern HPLC separations. Waltham, Ma: Elsevier; 2013.
16. Daniela Suarez O, Yovanny Morales H. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS. Fundación Universidad de América, editor. Revista Semilleros: Formación Investigativa [Internet]. 7 de septiembre del 2018;4, n° 1(diciembre del 2018):1–8. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
17. Rouessac F, Annick Rouessac. Chemical Analysis. John Wiley & Sons; 2013.

18. Universidad Central del Ecuador. Cromatografía de Líquidos [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-central-del-ecuador/fisicoquimica-i/cromatografia-de-liquidos/67327309>
19. Gradientes de exploración en cromatografía de líquidos preparativa | Waters [Internet]. Waters.com. 2023. Available from: <https://www.waters.com/nextgen/xg/es/education/primers/preparative-liquid-chromatography-primer/scouting-gradients.html>
20. Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, J. Fundamentos de química analítica. Novena edición. México: Cengage Learning; 2015.
21. Europa.eu. [cited 2024 Aug 12]. Available from: https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/ES/GeneralProcedures/SampleTransportation_ES.htm
22. La Comisión Europea F y. UA. Manipulación de las muestras [Internet]. 15 de septiembre del 2021. Disponible en: https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/ES/GeneralProcedures/SampleTransportation_ES.htm
23. López F, Martínez AG, López EF. Determinación de cafeína en café mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [Internet]. Upv.es. [citado el 4 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/104563/Fuentes%3BFuentes%3BGarc%C3%ADa%20-%20Determinaci%C3%B3n%20de%20cafe%C3%ADna%20en%20caf%C3%A9%20mediante%20cromatograf%C3%ADa%20de%20alta%20...pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=En%20la%20industria%20alimentaria%2C%20el,el%20cacao%20o%20el%20t%C3%A9.>
24. Benito D. Aloe Vera II: Superalimentos orgánicos ¡Y casi mágicos! [Internet]. Orgànics Magazine. Orgànics Magazine; 2016 [cited 2024 Sep 11]. Available from: <https://organics-magazine.com/aloe-vera-ii-alimentos/>
25. santuariofacial.org. Productos de *Aloe Vera* [Internet]. Santuario Facial. 2023 [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://santuariofacial.org/hidratacion/aloe/aloe-aloe/productos-de-aloe-vera/>
26. home - Innoagral laboratory - Agro-food analysis EN [Internet]. Innoagral laboratory - Agro-food analysis EN. 2021 [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://www.innoagral.com/>

27. Montserrat P. Cuáles son las peores marcas de bebidas con aloe, según Profeco [Internet]. infobae. infobae; 2023 [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://www.infobae.com/mexico/2023/08/04/cuales-son-las-peores-marcas-de-bebidas-con-aloe-segun-profeco/>
28. Villalobos L. Cromatograma HPLC Polifenoles de bajo peso Molecular [Internet]. ResearchGate; febrero del 2010. Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Figura-18-Cromatograma-HPLC-Polifenoles-de-bajo-peso-Molecular-Perfil-cromatografico_fig1_256980357
29. LC 1120 Compacto serie LC 1200 Y HPLC Agilent [Internet]. [cited 2024 Aug 13]. Available from: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/3_CiudadReal_HPLC.pdf
30. De El U, Facultad S, Química D, Farmacia Y, Baltrons E, Nilson V, et al. 2010 [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://oldri.ues.edu.sv/id/eprint/473/1/10136238.pdf>
31. Hernández Falcón D, Ledea Lozano OE, Fernández García LA, González García E. Validación de un método cromatográfico para la determinación de cafeína en muestras acuosas de la Industria Farmacéutica. Rev Cuba Farm [Internet]. 2015 [citado el 14 de septiembre de 2024];49(2):219–31. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000200004
32. Ulate-Molina R, Borbón-Alpízar H, Sibaja-Brenes JP, Vega-Guzmán I, Arguedas-González M. Validación de un método de detección mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD) para la determinación de aloína en productos alimenticios elaborados a partir de sábila (Aloe vera). Uniciencia Internet]. 2019;33(2):13–26. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/4759/475960592002/html/>
33. IARC-WHO. SOME DRUGS AND HERBAL PRODUCTS- IARC MONOGRAPHS [Internet]. Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer; junio del 2013, Vol. 108, Pag 56. Disponible en: <https://monographs.iarc.who.int/>
34. De marzo D. REGLAMENTO (UE) 2021/468 DE LA COMISIÓN [Internet]. Europa.eu. [citado el 28 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R0468&from=ES>
35. I. Amézquita-Cazarez K, Blanco-Aquino A, Macías-Pérez N, Id M, Karla A, Cazarez, et al. 2018;4:18–27. Available from: https://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Aplicacion_Cientifica_y_Tecnica/vol4num13/Revista_de_Aplicaci%C3%B3n_Cient%C3%ADfica_y_T%C3%A9cnica_V4_N13_4.pdf

ANEXOS

ANEXO N°1
REGLAMENTO (EU) 2021/468, PROHIBICIÓN DEL USO EN ALIMENTOS DE
CIERTAS ESPECIES BOTÁNICAS QUE CONTIENEN DERIVADOS
HIDROXIANTRACÉNICOS ³⁴

REGLAMENTO (UE) 2021/468 DE LA COMISIÓN

de 18 de marzo de 2021

por el que se modifica el anexo III del Reglamento (CE) n.º 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a las especies botánicas que contienen derivados hidroxiantracénicos

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n.º 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos ⁽¹⁾, y en particular su artículo 8, apartado 2, letra a), inciso i), y letra b),

Considerando lo siguiente:

- (1) De conformidad con el artículo 8, apartado 2, del Reglamento (CE) n.º 1925/2006, la Comisión, a iniciativa propia o basándose en la información facilitada por los Estados miembros, puede iniciar un procedimiento para incluir una sustancia o un ingrediente que contenga una sustancia que no sea una vitamina ni un mineral en el anexo III del Reglamento (CE) n.º 1925/2006, que establece la lista de sustancias cuyo uso en los alimentos está prohibido, restringido o sujeto a control de la Unión, si dicha sustancia representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores, en el sentido del artículo 8, apartado 1, de dicho Reglamento.
- (2) Las plantas que contienen derivados hidroxiantracénicos son numerosas y pertenecen a diferentes familias y géneros botánicos. Se utilizan ampliamente en complementos alimenticios.
- (3) En su dictamen científico, de 9 de octubre de 2013, sobre el fundamento científico de una declaración de propiedades saludables relativa a los derivados hidroxiantracénicos y la mejora del tránsito intestinal ⁽²⁾, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria («la Autoridad») llegó a la conclusión de que los derivados hidroxiantracénicos en los alimentos pueden mejorar el tránsito intestinal, pero desaconsejó su uso y consumo a largo plazo en dosis elevadas debido a posibles problemas de seguridad, como el riesgo de desequilibrio electrolítico, el deterioro de la función intestinal y la dependencia de los laxantes.
- (4) En vista de dicho dictamen y de las preocupaciones planteadas por los Estados miembros durante el debate sobre la declaración de propiedades saludables examinada en 2013 acerca de los posibles efectos nocivos asociados al consumo de alimentos que contienen derivados hidroxiantracénicos y sus preparados, en 2016 la Comisión solicitó a la Autoridad que emitiera un dictamen científico sobre la evaluación de la seguridad en el uso de los derivados hidroxiantracénicos en los alimentos de conformidad con el artículo 8 del Reglamento (CE) n.º 1925/2006.
- (5) La información facilitada por los Estados miembros a la Comisión cumplía las condiciones y los requisitos necesarios establecidos en los artículos 3 y 4 del Reglamento de Ejecución (UE) n.º 307/2012 de la Comisión ⁽³⁾.
- (6) El 22 de noviembre de 2017, la Autoridad adoptó un dictamen científico sobre la evaluación de la seguridad de los derivados hidroxiantracénicos para su uso en alimentos ⁽⁴⁾. Los derivados hidroxiantracénicos considerados pertinentes para esta evaluación del riesgo fueron los hallados en la raíz y el rizoma de *Rheum palmatum* L. o *Rheum officinale* Baillon o sus híbridos; en las hojas o los frutos de *Cassia senna* L.; en la corteza de *Rhamnus frangula* L., la corteza de *Rhamnus purshiana* DC. y las hojas de *Aloe barbadensis* Miller o diversas especies de *Aloe*, principalmente *Aloe ferox* Miller y sus híbridos.

⁽¹⁾ DO L 404 de 30.12.2006, p. 26.

⁽²⁾ EFSA Journal 2013;11(10):3412.

⁽³⁾ Reglamento de Ejecución (UE) n.º 307/2012 de la Comisión, de 11 de abril de 2012, por el que se establecen normas de desarrollo para la aplicación del artículo 8 del Reglamento (CE) n.º 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la adición de vitaminas y minerales y de otras sustancias determinadas a los alimentos (DO L 102 de 12.4.2012, p. 2).

⁽⁴⁾ Comisión Técnica de Aditivos y Aromas Alimentarios; *Scientific Opinion on the safety of hydroxyanthracene derivatives* [«Dictamen científico sobre la seguridad de los derivados hidroxiantracénicos», documento en inglés]. EFSA Journal 2018;16(1):5090.

- (7) La Autoridad constató que los derivados hidroxiantracénicos aloe-emodina y emodina y la sustancia estructuralmente relacionada dantrona han resultado ser genotóxicos *in vitro*. También los extractos de aloe han resultado ser genotóxicos *in vitro*, muy probablemente debido a la presencia de derivados hidroxiantracénicos en el extracto. Además, la aloe-emodina ha resultado ser genotóxica *in vivo*. El extracto de hoja entera de aloe y la sustancia estructuralmente análoga dantrona han resultado ser carcinógenos.
- (8) Dado que la aloe-emodina y la emodina pueden estar presentes en los extractos, la Autoridad llegó a la conclusión de que los derivados hidroxiantracénicos deben considerarse genotóxicos y carcinógenos a menos que existan datos específicos en sentido contrario, y de que existe un problema de seguridad para los extractos que contienen derivados hidroxiantracénicos, aunque persiste la incertidumbre. La Autoridad no pudo proporcionar asesoramiento sobre una ingesta diaria de derivados hidroxiantracénicos que no sea motivo de preocupación para la salud humana.
- (9) Teniendo en cuenta los graves efectos nocivos para la salud asociados al uso de la aloe-emodina, la emodina, la dantrona y los extractos de aloe que contienen derivados hidroxiantracénicos en los alimentos, y la imposibilidad de establecer una ingesta diaria de derivados hidroxiantracénicos que no sea motivo de preocupación para la salud humana, deben prohibirse dichas sustancias. Por tanto, la aloe-emodina, la emodina, la dantrona y los preparados de aloe que contienen derivados hidroxiantracénicos deben incluirse en el anexo III, parte A, del Reglamento (CE) n.º 1925/2006.
- (10) Durante la fabricación, los derivados hidroxiantracénicos pueden eliminarse de los preparados botánicos mediante una serie de procesos de filtrado que dan lugar a productos que contienen solo trazas de esas sustancias como impurezas.
- (11) Dado que existe la posibilidad de efectos nocivos para la salud asociados al uso de *Rheum*, *Cassia* y *Rhamnus*, y sus preparados, en los alimentos, pero persiste la incertidumbre científica sobre si dichos preparados contienen las sustancias indicadas en el anexo III, parte A, del Reglamento (CE) n.º 1925/2006, dichas sustancias deben estar sujetas al control de la Unión y, por tanto, deben incluirse en la parte C del anexo III del citado Reglamento.
- (12) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CE) n.º 1925/2006 en consecuencia.
- (13) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de Vegetales, Animales, Alimentos y Piensos.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo III del Reglamento (CE) n.º 1925/2006 se modifica como sigue:

- 1) En la parte A, se añaden las entradas siguientes en orden alfabético:
 - «Aloe-emodina y todos los preparados en los que esté presente esta sustancia»;
 - «Emodina y todos los preparados en los que esté presente esta sustancia»;
 - «Preparados de la hoja de especies de *Aloe* que contengan derivados hidroxiantracénicos»;
 - «Dantrona y todos los preparados en los que esté presente esta sustancia».
- 2) En la parte C, se añaden las entradas siguientes en orden alfabético:
 - «Preparados de la raíz o el rizoma de *Rheum palmatum* L., *Rheum officinale* Baillon y sus híbridos que contengan derivados hidroxiantracénicos»;
 - «Preparados de la hoja o el fruto de *Cassia senna* L. que contengan derivados hidroxiantracénicos»;
 - «Preparados de la corteza de *Rhamnus frangula* L. o *Rhamnus purshiana* DC. que contengan derivados hidroxiantracénicos».

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 18 de marzo de 2021.

Por la Comisión
La Presidenta
Ursula VON DER LEYEN
