

## Estado del arte en la estandarización de extractos vegetales

Wilson Leonardo Villarreal Romero<sup>1a</sup>, Jorge Eliecer Robles Camargo<sup>1b</sup>,  
Geison Modesti Costa<sup>c\*</sup>

Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Edificio Carlos Ortiz (52), Cra. 7 #43-82, Bogotá D.C., Colombia

ORCID:

<sup>a</sup><https://orcid.org/0000-0001-9468-9977>, <sup>b</sup><https://orcid.org/0000-0002-6782-5619>,

<sup>c</sup><https://orcid.org/0000-0003-2449-1986>

\*Autor de correspondencia: [modesticosta.g@javeriana.edu.co](mailto:modesticosta.g@javeriana.edu.co)

Recibido: 23 de enero de 2023

Revisado: 20 de abril de 2023

Aceptado: 27 de abril de 2023

### RESUMEN

**Introducción:** el aumento en el uso de plantas medicinales ha sido evidenciado en las últimas décadas en todo el mundo, principalmente como extractos vegetales con fines terapéuticos. Para garantizar la calidad y la eficacia de estos extractos se han establecido guías y normativas que reducen la variabilidad de los procesos de obtención y aseguran su estandarización. **Objetivo:** compilar datos actuales sobre los principales parámetros y metodologías para la estandarización de extractos vegetales y sus definiciones. **Metodología:** guías de la Organización Mundial de la Salud, Farmacopeas y las bases de datos PubMed, Google Académico, Science Direct y EBSCOHost fueron empleadas para coleccionar información acerca de la estandarización de extractos. Los documentos fueron seleccionados de acuerdo con su fecha de publicación (1981-2020), utilizando palabras-clave en inglés como “*standardization of plant extracts*”, “*standardization of methodologies*” y “*guidelines for obtaining standardized products*”. **Resultados:** las farmacopeas y las guías de la Organización Mundial de la Salud son la literatura principal que establecen las metodologías para la estandarización, así como los límites de parámetros relacionados con el control de calidad de extractos vegetales. Los principales parámetros establecidos fueron: evaluación macro y microscópica del material vegetal, materia extraña, contenido de cenizas, contenido de agua, análisis cromatográficos, análisis biológicos y evaluación química cualitativa y cuantitativa. **Conclusiones:** los principales documentos guías para la estandarización de extractos vegetales son generalmente aceptados en la

mayoría de las agencias regulatorias en diferentes países y determinan lineamientos relacionados con las características fisicoquímicas, biológicas y químicas analíticas del material vegetal y de los extractos.

**Palabras clave:** Estandarización, extractos, plantas medicinales, fitoterapéuticos, control de calidad.

## SUMMARY

### State of the art in the standardization of herbal extracts

**Introduction:** The increase in the use of medicinal plants has been evidenced in recent decades throughout the world, mainly as plant extracts with therapeutic purposes. To guarantee the quality and efficacy of these extracts, guidelines, and regulations have been established with the purpose to reduce the variability of obtaining processes and ensure their standardization. **Aim:** To compile current data on the main parameters and methodologies for the standardization of plant extracts and their definition. **Methodology:** World Health Organization guidelines, Pharmacopoeias and PubMed, Google Scholar, Science Direct, and EBSCOHost databases were used to collect information about extract standardization. The documents were selected according to their publication date (1981-2020), using keywords in English such as “standardization of plant extracts”, “standardization of methodologies” and “guidelines for obtaining standardized products”. **Results:** Pharmacopoeias and guidelines of the World Health Organization are the main literature that supported the methodologies for standardization, as well as the limits of parameters related to the quality control of plant extracts. The main parameters established were macro and microscopic evaluation of plant material, foreign matter, ash content, water content, chromatographic analysis, biological analysis, and qualitative and quantitative chemical evaluation. **Conclusions:** The main guide documents for the standardization of plant extracts are generally accepted by most regulatory agencies in different countries and determine guidelines related to the physicochemical, biological, and analytical chemical characteristics of plant material and extracts.

**Keywords:** Standardization, extracts, medicinal plants, phytotherapeutic, quality control.

## RESUMO

### Estado da arte na padronização de extratos vegetais

**Introdução:** o aumento do uso de plantas medicinais tem sido evidenciado nas últimas décadas em todo o mundo, principalmente na forma de extratos vegetais para fins terapêuticos. Para garantir a qualidade e eficácia desses extratos foram estabelecidos diretrizes e regulamentações que reduzem a variabilidade dos processos de obtenção e garantem sua padronização. **Objetivo:** compilar dados atuais sobre os principais parâmetros e metodologias de padronização de extratos vegetais e suas definições. **Metodologia:** diretrizes da Organização Mundial da Saúde, Farmacopeias e bancos de dados PubMed, Google Scholar, Science Direct e EBSCOHost foram usados para coletar informações sobre padronização de extratos. Os documentos foram selecionados de acordo com a data de publicação (1981-2020), utilizando palavras-chave em inglês como “padronização de extratos vegetais”, “padronização de metodologias” e “diretrizes para obtenção de produtos padronizados”. **Resultados:** farmacopeias e diretrizes da Organização Mundial da Saúde são as principais literaturas que estabelecem as metodologias para padronização, bem como os limites de parâmetros relacionados ao controle de qualidade de extratos vegetais. Os principais parâmetros estabelecidos foram avaliação macro e microscópica do material vegetal, matéria estranha, teor de cinzas, teor de água, análise cromatográfica, análise biológica e avaliação química qualitativa e quantitativa. **Conclusões:** os principais documentos orientadores para a padronização de extratos vegetais são geralmente aceitos na maioria das agências reguladoras em diferentes países e determinam diretrizes relacionadas às características físico-químicas, biológicas e químicas analíticas de materiais vegetais e extratos.

**Palavras-chave:** Padronização, extratos, plantas medicinais, fitoterápicos, controle de qualidade.

## INTRODUCCIÓN

El uso de medicinas herbales históricamente ha constituido una práctica importante, incluso en la medicina actual en donde más del 80% de la población utiliza y/o depende de plantas medicinales. Pero este amplio uso ha generado en algunos casos errores de medicación, adulteración o abuso en el consumo de los productos medicinales a base de plantas, produciendo efectos nulos o negativos para la salud de los consumidores. De ahí el hecho que sea necesario el establecimiento de parámetros de

control de calidad para la recolección, manejo, procesamiento y producción, garantizando la buena calidad y consecuentemente la eficiencia y la seguridad de medicamentos y productos a base de plantas [1-4].

De esta forma la Organización Mundial de la Salud (OMS–WHO por sus siglas en inglés) en 1978 en la declaración de Alma Anta, mediante la resolución WHO 31.33 teniendo en cuenta la importancia de las plantas medicinales en la salud, recomendó la creación de un inventario de plantas empleadas con fines terapéuticos en diferentes países, el desarrollo de métodos que aseguren la calidad y la eficacia de tratamientos con plantas medicinales, estándares internacionales que especifiquen la identidad, la pureza, los métodos seguros de utilización y las buenas prácticas de manufactura. Estos puntos fueron reafirmados en 1987 en la 40ª Asamblea General de la OMS mediante la resolución 40.33 la cual incentiva a seguir programas de identificación, cultivo y conservación de plantas medicinales, con el fin de asegurar la calidad mediante estándares y buenas prácticas de manufactura de los productos medicinales obtenidos a partir de estas plantas [5-10].

En muchos países los productos herbales medicinales o fitoterapéuticos son liberados al mercado sin una evaluación científica debida y teniendo en cuenta que la mayoría de estos productos pueden ser adquiridos sin prescripción, principalmente en países de América Latina, se vuelve importante la producción de fitoterapéuticos de calidad con una composición constante y bien definida, lo cual se logra mediante la estandarización [2, 10-15]. El proceso de estandarización de extractos es específico y por lo tanto diferente para cada especie, por lo cual el objetivo de esta revisión fue presentar definiciones, lineamientos y metodologías generales para la obtención de extractos estandarizados, de modo que pueda servir como fuente de información base para estos procesos.

## METODOLOGÍA

Esta revisión se llevó a cabo mediante la búsqueda en la literatura científica en lo referente a extractos estandarizados, métodos de estandarización, sus aplicaciones y su justificación. Compilando información desde los aspectos básicos y fundamentales, hasta estudios de estandarización actuales y específicos. Para esta revisión se utilizaron las bases de datos: Science Direct, Academic Search Complete (EBSCOHost), PubMed y el motor de búsqueda de Google Académico, así como capítulos y libros especializados, normas nacionales e internacionales y directrices establecidas por la OMS y las farmacopeas: Brasileña, Estadounidense y Europea.

Los documentos fueron escogidos de acuerdo con sus fechas de publicación (entre los años 1981 y 2020), usando palabras clave en inglés tales como: “standardization of

plant extracts”, “natural products”, “standardization of methodologies” and “guidelines for obtaining standardized products”. El conjunto de información finalmente incluyó 95 referencias, entre artículos científicos publicados, guías, normas, libros y monografías de farmacopeas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Consideraciones legales

Según el país y sus normativas se emplean términos como fitoterapéuticos o fitomedicamentos, términos que pueden cambiar en algunos aspectos en cuanto a sus definiciones [16, 17]. Los fitoterapéuticos son un tipo de preparación herbaria derivada de partes de una o varias plantas, en donde los principios activos no se encuentran de forma aislada. Son obtenidos por diferentes formas de procesamiento del material vegetal y estos pueden ser material triturado, aceites esenciales o extractos, entre otros [16, 18]. Los extractos que son obtenidos sin la aplicación de sustancias inertes, se denominan extractos naturales y están definidos como preparaciones herbarias [19, 20], de consistencia líquida, sólida o semisólida (extractos blandos obtenidos por evaporación parcial del solvente) o tinturas (preparaciones líquidas obtenidas por extracción con alcohol) [17]. Cabe mencionar que los extractos vegetales no solo son aplicables a la medicina y la farmacéutica, es conocida también su función en la nutraceutica, por ejemplo, para la cual sus normativas suelen ser distintas y no serán abordadas en esta revisión [21-24].

La IV Conferencia Internacional de Organismos de Reglamentación Farmacéutica realizada en Tokio en 1986 avanzó en la legislación de productos medicinales derivados de plantas, principalmente en temas relacionados con la explotación comercial. En la conferencia número V llevada a cabo en París en 1989, se amplió la reglamentación y se recomendó que la OMS examinara la preparación de dichas plantas y generara normas que ayudaran en el proceso de reglamentar la preparación en un contexto global, para esto la OMS estableció una serie de lineamientos para la evaluación de medicamentos de origen vegetal. Y que junto a la Organización de Naciones Unidas para el Desarrollo (ONUDI) han hecho importantes esfuerzos para que el empleo de estos medicamentos de origen vegetal sea una solución real alternativa a los fármacos sintéticos de elevado costo [5].

En Colombia, país de los autores, los fitoterapéuticos están reglamentados por el decreto 2266 del 2004 [25], modificado por los decretos 3553 de 2004 [26], 4927 de 2009 [27] y el decreto 1156 del 2018 [28], emitidos por el Ministerio de Salud y Protección Social que definen los productos fitoterapéuticos como: *“Es el producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de material de la*

*planta medicinal o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos. También puede provenir de extractos, tinturas o aceites. No podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos. Los productos obtenidos de material de la planta medicinal que haya sido procesado y obtenido en forma pura no será clasificado como producto fitoterapéutico”* [25, 28]. También se establece en estos decretos que la vigilancia y el registro sanitario de los productos fitoterapéuticos en nuestro país corresponde al Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) [25-28]. Mientras que en el caso de Brasil es la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) [29, 30], en México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) [31] y para los Estados Unidos la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) [32, 33].

### **Estandarización de extractos vegetales**

La estandarización de extractos vegetales se refiere al establecimiento de una serie de parámetros y valores en un proceso dado, que permitan garantizar la calidad, la eficacia, la estabilidad y la reproducibilidad. No existe una definición universal de lo que es “estandarización de extracto” pero en general se refiere al establecimiento de la cantidad definida de un compuesto o grupo de compuestos con una actividad terapéutica determinada (principio activo o mezclas de este) dentro de un extracto y a la metodología empleada para llegar a él [21, 34, 35]. Los extractos estandarizados contienen una cantidad constante de componentes específicos (principios activos) o mezclas con ellos, sujetos a controles de calidad durante todas sus fases de preparación, por lo tanto, la estandarización no se refiere únicamente a procesos uniformes de fabricación [1, 2, 21, 36-38].

La estandarización junto con el control de calidad tiene en cuenta los procesos que contribuyen a la identidad y calidad de un medicamento de origen vegetal, estos procesos incluyen: obtención del material vegetal, identificación, evaluación cuantitativa, evaluación cualitativa, caracterización fitoquímica, estabilidad y almacenamiento, de igual forma la obtención y suministro de la información del producto final al consumidor [1, 38, 39].

El proceso de estandarización de extractos vegetales también se puede entender como la caracterización técnica obtenida mediante experimentación y observaciones que conducen a un conjunto de características específicas para un medicamento de origen vegetal. En otras palabras, la estandarización también es “*una herramienta en el proceso de control de calidad*” [1], cuyos lineamientos se encuentran en los documentos guía de la OMS y las farmacopeas [15, 40, 41].

Por otra parte, la Agencia Europea de Medicina (EMA) define la estandarización de sustancias (extractos) vegetales como: “*Las sustancias herbales estandarizadas se ajustan dentro de una tolerancia aceptable a un contenido dado de constituyentes con actividad terapéutica conocida; La estandarización se logra agregando excipientes para el ajuste a la sustancia a base de hierbas o mezclando lotes de la sustancia a base de hierbas. Para tales sustancias a base de hierbas, debe indicarse el nombre y el contenido de los constituyentes con actividad terapéutica conocida. Se debe dar la cantidad equivalente de la sustancia herbal genuina (como un rango, si corresponde)*” [42]. De esta definición se entiende que el producto final debe contener componentes activos de identidad y cantidad conocida o en un rango de cantidad [42].

### ¿Qué se estandariza?

Los parámetros requeridos y algunos de sus límites para productos fitoterapéuticos, entre los que se clasifican los extractos estandarizados, son enunciados por la OMS y las farmacopeas que establecen usos terapéuticos estandarizados de plantas medicinales y publican monografías de especies medicinales con información sobre la descripción botánica [7, 9, 43-48]. Los parámetros están descritos en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Requerimientos establecidos para productos fitoterapéuticos.

Material	Límites permitidos	Referencia
<b>Para el material vegetal</b>		
Caracterización botánica	Parámetros cualitativos intrínsecos del tipo de planta.	[14, 16]
Examen macro y microscópico	Parámetros cualitativos intrínsecos del tipo de planta/extracto.	[7, 46]
Materia extraña	< 2%.	[7, 46, 49]
Valores de ceniza	Intrínseco de cada planta, por lo general < 5% para cenizas totales y < 2% para cenizas insolubles en ácido.	[7, 17, 49]
Contenido de humedad	Intrínseco de cada planta, generalmente < 10%.	[7, 46, 49]
Valores extractivos	Intrínsecos para cada tipo de planta.	[7, 46, 49]

(Continúa)

Material	Límites permitidos	Referencia
Carga microbiana	Para extracciones por decocción: **TAMC: $10^7$ CFU/g ***TYMC: $10^5$ CFU/g Para extracciones por solventes orgánicos: TAMC: $10^4$ CFU/g o CFU/mL TYMC: $10^2$ CFU/g o CFU/mL	[46, 49]
Residuos de pesticidas	Acefato 0,2 mg/Kg Clorpirifós 5 mg/Kg Dicofol 0,05 mg/Kg Este parámetro se amplía en la tabla 3	[7, 46, 49]
Contenido de metales pesados	Cadmio: < 1,0 ppm Plomo: < 5,0 ppm Mercurio: < 0,1 ppm	[7, 49]
<b>Para el extracto</b>		
VARIABLES DEL PROCESO EXTRACTIVO (SOLVENTES Y MÉTODO EXTRACTIVO)		[14, 16]
ANÁLISIS CROMATOGRAFICO		[14, 17]
EVALUACIÓN QUÍMICA CUALITATIVA (TAMIZAJE FITOQUÍMICO)		[7, 16]
EVALUACIÓN QUÍMICA CUANTITATIVA		[14, 16]
ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS		[14, 15, 17]

\*Recuento total de microorganismos aerobios (TAMC). \*\* Unidad formadora de colonias (UFC) por gramo de material vegetal. \*\*\* Recuento total de hongos y levaduras (TYMC)

### ¿Cómo se estandariza? Caracterización del material vegetal

Los criterios para caracterización y evaluación de plantas medicinales pueden variar entre las diferentes farmacopeas que existen, pero hay lineamientos que son comunes a la mayoría de las disposiciones legales de cada país. Teniendo en cuenta las farmacopeas Brasileña, Europea y Estadounidense junto con los requerimientos de la OMS, los ensayos contemplados para el análisis de drogas vegetales antes de ser empleadas para la elaboración de un fitoterapéutico se describen globalmente a continuación [2, 6, 7, 46, 50-52].

### *Recolección del material vegetal*

El momento de recolección de las plantas medicinales depende de la especie, las condiciones climáticas y el ciclo de la planta. Para su recolección se puede realizar un seguimiento previo, con el fin de conocer la edad de la planta y la mejor época para su recolección. Este seguimiento se puede realizar con extracciones continuas por un periodo de tiempo determinado analizando los extractos mediante alguna técnica cromatografía [13, 50].

### *Limpieza*

Al limpiar las partes vegetales colectadas se retiran todas las impurezas como tierra, insectos partes de otras plantas y partes dañadas necrosadas o con marcas de herbivoría. Parte del procedimiento se realiza manualmente. Se puede realizar un lavado con agua para limpiar el material adherido, de igual forma se puede realizar una desinfección con hipoclorito de sodio de concentración menor al 1% durante 5 minutos, con el fin de limitar una posible infección bacteriana, pero se corre el riesgo de oxidar los componentes activos [50, 53].

### *Secado del material vegetal*

El secado del material facilita su almacenamiento durante periodos de tiempo relativamente largos, conservando las propiedades químicas de los compuestos, a su vez detiene los procesos bioquímicos de la planta e impide la contaminación por hongos [13, 54]. El secado se puede llevar a cabo a temperatura ambiente usualmente en sombra o en hornos con circulación de aire entre 30 °C y 60 °C [13, 53].

### *Evaluación microscópica y macroscópica*

El primer paso para establecer la identidad y pureza es la descripción macro y microscópica. La evaluación microscópica es indispensable en la identificación de plantas y de fragmentos de material vegetal producto de estas, así mismo es necesaria para la identificación de materia extraña y adulterantes. En ella se emplea la evaluación visual primaria con ayuda de reactivos que faciliten la visualización y de un microscopio o un estereoscopio para la identificación taxonómica correcta y asegurar que se está empleando la parte de interés de la planta. Esta identificación se hace con ayuda de una muestra autentica de referencia de la planta [1, 6, 46, 50, 52, 55, 56]. Se analizan características de las paredes celulares, contenido celular (almidón), presencia de tricomas, índice de estomas (relación estomas/área de la hoja) y materia extraña, entre otros [15]. En la evaluación macroscópica se describen las características externas de los órganos vegetales, la OMS recomienda proceder evaluando, tamaño, color, superficie,

olor (intensidad del olor: suave, fuerte. Tipo de aroma: aromático, mohoso, rancio) y describiendo las características morfológicas de tamaño, borde y textura [6, 46, 55].

### Molienda del material vegetal y distribución del tamaño de partícula

La molienda o trituración de material se realiza con el fin de aumentar la superficie del material vegetal que va a estar en contacto con el solvente de extracción, y de esta forma aumentar la penetración y el poder extractivo. Por otro lado, la formación de polvo muy fino puede dificultar los procesos de extracción. Durante este proceso materiales extraños o no deseados pueden ser identificados y retirados manualmente [2, 49].

Independientemente del proceso de trituración, se generan partículas de diferentes tamaños, estas partículas o fragmentos deben ser seleccionadas usando tamices con luz de malla de diferente diámetro, y el material a tamizar debe llevar una cantidad (peso) definida. La OMS y la farmacopea Brasileña clasifican los diferentes tipos de polvo (Tabla 2) [13, 46, 49, 51].

**Tabla 2.** Clasificación de los tipos de polvo de acuerdo con el material vegetal que pasa en su totalidad por determinado tamiz [46, 49, 51].

Clasificación	Tamiz
Polvo grueso	tamiz de 1,70 mm
Polvo moderadamente grueso	tamiz de 0,71 mm
Polvo semifino	tamiz de 0,33 mm
Polvo fino	tamiz de 0,18 mm
Polvo finísimo	tamiz de 0,12 mm

### *Determinación de cenizas*

El contenido de ceniza refleja el contenido de materia inorgánica. Para su determinación el material vegetal se incinera y las cenizas residuales son pesadas determinando la cantidad de ceniza total, ceniza insoluble en ácido y ceniza soluble en agua. La determinación de cenizas totales se realiza para medir la cantidad de ceniza correspondiente al material vegetal y al material restante que corresponde a materia extraña, las cenizas totales no deben superar el 12% respecto al material vegetal, valores más altos se pueden deber a contaminación con suelo [6, 7, 46, 57].

### *Determinación de humedad y pérdida por secado*

Generalmente el contenido de agua de las drogas vegetales varía entre 8% y 14%, este contenido se debe mantener bajo para evitar hidrólisis de los compuestos y posibles contaminaciones microbiológicas. El contenido de agua puede ser determinado por el

método gravimétrico (secar hasta peso constante), azeotrópico (destilación de la muestra junto con tolueno) y el método de Karl Fischer (reacción cuantitativa entre agua, yodo y dióxido de azufre en piridina) [46, 50, 51].

#### *Determinación de sustancias extraíbles*

Este procedimiento se realiza en el caso que no se puedan determinar los componentes activos de la droga. Se puede realizar entonces una determinación de las sustancias extraídas con agua y/o etanol [13, 46, 51, 58].

#### *Determinación de material extraño*

Los extractos vegetales regularmente provienen de una sola parte de la planta, es decir de un órgano específico, por lo tanto, debe asegurarse que no haya fragmentos de otras partes de la planta o de otras plantas, también se debe detectar la presencia de insectos o de material inorgánico [7, 46, 51, 59]. De existir contaminación se recomienda eliminar de forma mecánica directamente sobre el material vegetal, en caso de que este esté fraccionado en partes grandes [51, 60].

#### *Contaminantes microbiológicos*

La contaminación con microorganismos está asociada con factores ambientales de difícil control. La carga de microorganismos en el material vegetal se ve favorecida también por malas prácticas de cosecha, limpieza, secado y almacenamiento. También existen métodos de descontaminación que están restringidos, como el tratamiento de radiación ionizante, por lo tanto, debe cuidarse tanto el método de limpieza como de la presencia de microorganismos y posibles toxinas producidas por estos [7, 46, 61]. Los microorganismos que están presentes en el material vegetal pueden proliferar en los procesos de secado y almacenamiento [1]. Los límites para la contaminación microbiana están dados por farmacopeas, pero no son de implementación obligatoria [1, 17].

#### *Determinación de metales pesados*

La contaminación ambiental y las trazas de pesticidas son responsables en gran medida de la presencia de metales pesados en el material vegetal. Su contaminación es importante en la salud debido a que su acumulación en el organismo resulta tóxica [6-8, 46]. Existen varios tipos de determinación de estos metales cuyo contenido se debe comparar con un valor o rango estándar (ver Tabla 1). Un método común para su identificación es la espectrofotometría de absorción atómica [62].

#### *Residuos de pesticidas*

Dado que la mayoría de los productos naturales provienen de plantas cultivadas, existe una alta probabilidad de que estén contaminados con residuos de pesticidas acumula-

dos por las prácticas agrícolas como la aplicación de abonos químicos y de fungicidas. Para su detección se pueden hacer pruebas generales que reconozcan grupos de pesticidas o pesticidas individuales [6, 8, 46]. Se recomienda realizar pruebas generales para detectar cloro orgánico total, fosforo orgánico total, arsénico y plomo total. El análisis debe realizarse lo más pronto luego de la recolección del material vegetal antes de que tengan lugar cambios químicos. Los valores máximos permitidos de pesticidas dependen del grupo químico al que pertenezcan, (organoclorados, organofosforados, etc.), y sus límites son reportados por la OMS y la farmacopea Europea (Tabla 3) [6, 33, 46, 63].

**Tabla 3.** Límites máximos permitidos de algunos pesticidas [38, 49].

Pesticida	Límite máximo de residuo (mg/Kg)
Acefato	0,2
Azinfos.Metil	0,5
Clorpirifós	5
Clorpirifós-Metil	1
Diazinón	5
Dicofol	0,05

### *Extracción*

Es importante mencionar que incluso obteniendo material vegetal consistente y siguiendo las normas de estandarización en el tratamiento del material vegetal, el extracto resultante podrá no ser igual en caso de que no se haga el control del proceso extractivo. La extracción se realiza poniendo en contacto el material particulado con el solvente extractor. La elección del solvente va a depender del tipo de material y del tipo de compuestos a extraer [64-68]. En cuanto a la cantidad de material vegetal y la proporción de solvente, esta se podrá determinar realizando pruebas preliminares de extracción verificadas por cromatografía.

### **Control de calidad de los extractos vegetales**

#### *Evaluación química*

Uno de los aspectos más importantes en la estandarización de un extracto es la evaluación química. Uno de los pasos más comunes e iniciales en esta etapa es el tamizaje o *screening* fitoquímico, que se refiere a las diferentes pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios como: terpenos, alcaloides, cumarinas, lactonas, taninos, fenoles, flavonoides, glucósidos cardiotónicos, saponinas, esteroides, quinonas, lignanos, cromanos y catequinas, principalmente [13, 69].

Otras pruebas más robustas para identificación y que además pueden proporcionar un análisis cuantitativo son las técnicas Cromatografía en Capada Delgada (TLC), Cromatografía en Capada Delgada de alta Resolución (HPTLC), Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), acoplada a diferentes detectores como Ultravioleta (UV), Detector de Arreglo de Diodos (DAD) y Espectrometría de Masas (MS), Cromatografía de Gases (GC), también con distintos detectores como ionización de llama (FID) o MS. Otras técnicas menos comunes en etapas del control de calidad, pero también bastante eficientes son la Electroforesis Capilar (CE) y la Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Los resultados de estas técnicas generan huellas químicas cromatográficas sobre la cuales se pueden comparar cualitativa y cuantitativamente con otras muestras [1, 15, 70, 71]. Por ser las técnicas más comunes en estos procesos, se dará especial énfasis en dos de ellas: TLC y HPLC, descritas a continuación.

### **Cromatografía en Capa Delgada (TLC) para el análisis de productos fitoterapéuticos**

La cromatografía en capa delgada es una técnica importante en el monitoreo necesario de componentes químicos para el proceso de estandarización y control de calidad de los extractos vegetales, ya que es una técnica poco costosa comparada a las demás técnicas cromatográficas. Respecto al control de calidad el primer paso es identificar los compuestos que están presentes y son característicos de la planta y cuáles de estos poseen actividad farmacológica. Se deben escoger los solventes más apropiados como sistema de elución para el desarrollo cromatográfico, junto con los reveladores a emplear para la visualización de los compuestos presentes en el extracto. La etapa siguiente es el monitoreo de compuestos específicos, los cuales servirán como marcadores ayudando a identificar el extracto y por consiguiente la planta [70-75].

Los marcadores químicos son componentes conocidos químicamente con o sin actividad terapéutica, estos pueden ser marcadores analíticos o marcadores activos. *“Los marcadores analíticos son los constituyentes o grupos de constituyentes que sirven únicamente para fines analíticos, mientras que los marcadores activos son los constituyentes o grupos de constituyentes que contribuyen a la actividad terapéutica”* [76]. Estos marcadores cobran importancia en la identificación de compuestos adulterantes, la diferenciación de medicinas vegetales provenientes de diferentes fuentes y en la verificación de la estabilidad de los fitoterapéuticos [76].

Independiente del nivel de conocimiento de la composición química del extracto, se acepta como un análisis válido en el control de calidad la obtención de un perfil cromatográfico. A este perfil se le conoce como huella digital o *fingerprint* de la planta. Esto es funcional siempre y cuando el proceso de obtención de la planta posea condiciones definidas (estandarizadas). De esta forma un segundo extracto obtenido en las mismas condiciones de colecta, procesamiento y extracción deberá ser comparable al realizar la

misma prueba cromatográfica. Los resultados de la TLC se comparan por los factores de retención ( $R_f$ ), tamaños y coloraciones de los compuestos. Una variación de esta técnica de TLC es la HPTLC, automatizada y de mayor resolución y precisión, permitiendo además la cuantificación mediante densitómetros [13, 77].

### **Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para el análisis de productos fitoterapéuticos**

Esta técnica es la más ampliamente utilizada en el control de calidad de extractos vegetales. Así como se describió anteriormente, esta técnica también permite la obtención del perfil cromatográfico de los extractos, en este caso, visualizados por medio de picos cromatográficos [78, 79].

Los detectores empleados en esta técnica dependen de las estructuras que se desea analizar. Los detectores UV son los más utilizados, permitiendo el análisis de los compuestos que poseen grupos cromóforos. La variación de este, llamada DAD o PDA (detección por arreglo de fotodiodos) permite obtener el espectro de absorción de un determinado compuesto y por consiguiente la comparación de espectros con un banco de datos o literatura, donde se puede estimar la naturaleza química de los componentes de un extracto. Adicionalmente, otros detectores comúnmente empleados son: Detector Evaporativo de Dispersión de Luz (ELSD) el cual es empleado para la detección de moléculas sin grupos cromóforos que resultan indetectables en UV, se fundamenta en la nebulización de sustancias formando un spray homogéneo de gotas que pasan por un detector de aerosol cargado, y el detector MS el cual separa moléculas orgánicas ionizadas de acuerdo a su masa y carga, posteriormente estos iones son detectados por un analizador de campo magnético; analizador cuadrupolar o un analizador de trampa de iones [13, 58, 70, 80-82].

#### *Validación*

La validación es el proceso de probar que un método analítico es aceptable para su propósito previsto [1]. También permite establecer criterios de adaptación para pruebas determinadas. La Farmacopea de los Estados Unidos [17], la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) [83] y la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) [84] suministran una serie de lineamientos para realizar las validaciones. La validación debe incluir estudios de linealidad, especificidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación [1, 46, 84-88].

#### *Parámetros de validación*

*Precisión:* grado de proximidad entre una variedad de mediciones individuales obtenidas a partir de una misma muestra con una metodología determinada. La precisión

puede ser considerada en, **Repetibilidad**: precisión en las mismas condiciones de operación en un tiempo dado. Es evaluada realizando varias veces la misma medición y viendo el grado de variación entre las mediciones. **Precisión intermedia**: precisión que tiene en cuenta las variaciones. **Reproducibilidad**: precisión entre laboratorios, grado de proximidad de un resultado a partir de muestras diferentes con una metodología determinada [1, 83, 84, 87, 88]. **Seguridad**: uso probado y posibles efectos adversos de los principios activos, principalmente en lo relacionado con la toxicidad [8]. **Exactitud**: grado de proximidad entre el resultado de una medición experimental y un valor teórico (estándar) en una misma muestra con una metodología determinada. **Límite de detección**: Es la cantidad mínima a la que un analito en una muestra puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado. **Límite de cuantificación**: Cantidad mínima de un analito en ser cuantificada con exactitud. **Linealidad**: Capacidad de un procedimiento analítico de obtener un resultado proporcional a la concentración de una muestra o de un analito dentro de una muestra [83, 84, 87, 88]. **Identidad y pureza**: se refiere a la posible contaminación de la droga o del extracto. Para controlar la identidad y la pureza de un extracto principalmente se realizan pruebas cromatográficas con el fin de identificar la presencia de posibles adulterantes [7, 59, 89]. Los valores de los parámetros de validación se resumen en la Tabla 4.

### *Estabilidad*

La estabilidad se refiere a la capacidad de un producto farmacéutico de conservar sus características biológicas y farmacéuticas junto con sus propiedades físicas y químicas dentro de los límites especificados (en la estandarización) en un tiempo dado. La estabilidad se estima con base en la cantidad y tiempo exposición a condiciones controladas de luz, temperatura y humedad del ambiente, y de las características propias del compuesto a almacenar, es decir su solubilidad, volatilidad, degradabilidad y reactividad química [2, 52, 90-93].

Los objetivos de evaluar la estabilidad de un producto (extracto vegetal) o principio activo son mantener la pureza, la potencia, la concentración y la efectividad, en un tiempo dado, lo cual es evaluado mediante pruebas de estabilidad que hacen parte del control de calidad de un producto fitoterapéutico [2, 52, 93, 94].

Los estudios de estabilidad para extractos vegetales emplean guías similares a las utilizadas para fármacos y medicamentos. Y se pueden valorar vía 3 ensayos principales: ensayo por estrés, estabilidad acelerada y estabilidad intermediaria. Su análisis se realiza principalmente mediante HPLC o TLC [93, 95, 96].

**Tabla 4.** Procedimientos generales y valores de los parámetros de validación.

Parámetro de Validación	Procedimientos Analíticos Generales	Referencia
Exactitud	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se determinan 3 concentraciones con tres réplicas, en un rango específico.</li> <li>• Se determinan el % de recuperación. Considerando la media y la desviación estándar relativa (DSR), como estimados de precisión.</li> <li>• % de exactitud entre 80 y 120 %</li> </ul>	[83, 84]
Precisión	<p>Repetibilidad:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones realizadas por un único analista y bajo las mismas condiciones.</li> <li>• Se realizan mínimo 9 o 10 mediciones diferentes, teniendo en cuenta la exactitud.</li> <li>• DSR recomendadas, &lt; 11%</li> </ul> <p>Precisión Intermedia:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones realizadas en días y analistas diferentes</li> <li>• Se realizan mínimo 9 o 10 mediciones diferentes, teniendo en cuenta la exactitud.</li> <li>• DSR recomendadas, &lt; 11%</li> </ul>	[83, 84]
El límite de Detección	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se expresa como el producto de la pendiente de la curva de calibración y 3.3, dividido entre la desviación estándar del blanco o del intercepto en el eje y, de la curva de calibración.</li> <li>• Puede ser expresado como 2 o 3 veces la señal del ruido.</li> <li>• También puede ser determinado visualmente analizando bajas concentraciones conocidas de un analito.</li> </ul>	[84, 88]
El límite de Cuantificación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es el producto de la pendiente de la curva de calibración y 10, dividido entre la desviación estándar del blanco o del intercepto en el eje y, de la curva de calibración.</li> <li>• Puede ser expresado en una proporción señal ruido de 10:1 respecto a un analito determinado.</li> <li>• También puede ser determinado visualmente analizando bajas concentraciones conocidas de un analito.</li> </ul>	[84, 88]

Parámetro de Validación	Procedimientos Analíticos Generales	Referencia
Linealidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se establece con rango de mínimo 5 concentraciones, obtenidas de una solución stock.</li> <li>• Se evalúa mediante regresión lineal, entre la relación concentración-sígnal.</li> <li>• Se debe tener en cuenta el intercepto en el eje <i>y</i>, el coeficiente de correlación y la pendiente.</li> <li>• El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0.999.</li> </ul>	[84, 88]
Especificidad/ selectividad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se determina por identificación del analito de interés y por discriminación de impurezas.</li> <li>• Los análisis de selectividad pueden incluir ensayos de estabilidad que permitan comparar muestras que contengan impurezas y/o productos de degradación.</li> </ul>	[84, 88]
Robustez	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se realizan pruebas de idoneidad del sistema o procedimiento a evaluar, comprobando la validez del procedimiento analítico.</li> </ul> <p>Comúnmente se evalúa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incidencia del pH</li> <li>• Temperatura</li> <li>• Tiempo de extracción</li> <li>• Estabilidad de las soluciones analíticas</li> </ul>	[83, 88]

## CONCLUSIÓN

Los medicamentos a base de especies vegetales principalmente en forma de extractos, son una fuente importante para la industria farmacéutica, pero aún existen vacíos en el establecimiento de su calidad, por lo que se hace imperante la necesidad de estandarizar estos productos derivados de vegetales. Los principales Documentos Guía para la estandarización y el control de calidad, han sido generados por la OMS y por las farmacopeas. Se ha creado una gran variedad de métodos y de herramientas analíticas para evaluar diferentes parámetros de calidad que garanticen la calidad y la eficiencia de un fitoterapéutico, junto con metodologías para eliminar la variabilidad de los productos vegetales, todo esto con el fin de obtener extractos estandarizados como productos finales, con alto grado de calidad, eficiencia y reproducibilidad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Pontificia Universidad Javeriana, al Ministerio de Ciencia y Tecnología, al Ministerio de Educación, al Ministerio de Industria, Empresa y Turismo, ICETEX y a la convocatoria “Ecosistema Científico” (792-2017) por permitirnos participar y contribuir al proyecto “Generación de soluciones terapéuticas alternativas a base de plantas para combatir el cáncer a través de la investigación y el desarrollo traslacional y su consolidación en un sistema sostenible económica y ambientalmente” (contrato No. FP44842-221-2018) financiado por el Banco Mundial y consolidando la excelencia en la investigación y la innovación en nuestro país.

## FINANCIAMIENTO

Los autores confirman haber recibido el siguiente apoyo financiero para la investigación, autoría y / o publicación de este artículo: El financiamiento fue proporcionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Colombia (792-2017 2da Convocatoria de Ecosistema Científico para el financiamiento de I + D + i), Banco Mundial y Vicerrectoría de Investigaciones, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia (contrato No. FP44842-221-2018).

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflictos de interés.

## REFERENCIAS

1. O.F. Kunle, M.O. Egharevba, P.O. Ahmadu, Standardization of herbal medicines - A review, *Int. J. Biodivers. Conserv.*, **4**, 101-112 (2012).
2. S. Echeverry, *Aporte a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de Passiflora quadrangularis*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, 2017.
3. C.S. Jackson, J.S. Han, H. El-Nezami, Herbal medicine: Toxicity and recent trends in assessing their potential toxic effects, en: L.F. Shyur, A.S.Y. Lau (editors), *Advances in Botanical Research*, Academic Press, Oxford, 2012, Vol. 62, pp. 365-384.

4. M.S. Ahmad, I. Ahmad, Chapter 1 - Herbal Medicine: Current Trends and Future Prospects, en: M. Sajjad, A. Khan, I. Ahmad, D. Chattopadhyay (editors), *New Look to Phytomedicine Advancements in Herbal Products as Novel Drug Leads*, Academic Press, Oxford, 2019, pp. 3-11.
5. M. Vega, *Etnobotánica de la Amazonia Peruana*, Ediciones Abya-Yala, Quito, 2001, pp. 51-55.
6. World Health Organization (WHO), *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, WHO, Geneva, 1992.
7. World Health Organization (WHO), *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, WHO, Geneva, 1998.
8. World Health Organization (WHO), *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, WHO, Geneva, 2000.
9. World Health Organization (WHO), "Global Atlas of Traditional, Complementary and Alternative Medicine", WHO, Geneva, 2005.
10. R. Bauer, Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved? *Drug Inf. J.*, **32**, 101-110 (1998).
11. J.B. Calixto, Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**(2), 179-189 (2000).
12. M.O. Nafiu, A.A. Hamid, H.F. Muritala, S.B. Adeyemi, Preparation, standardization, and quality control of medicinal plants in Africa, en: V. Kuete (editor), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Université de Dschang, Cameroon, 2017, pp. 171-207.
13. N. Sharapin, *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*, CYTED, Santa Fé de Bogotá, 2000.
14. M. Mosihuzzaman, M.I. Choudhary, Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine, *Pure Appl. Chem.*, **80**(10), 2195-2230 (2008).
15. K. Anupam, V. Garima, K. Roopak, Need of standardization of herbal medicines in modern era, *Int. J. Phytomed.*, **8**(3), 300-307 (2016).

16. A. Pandei, S. Tripathi, Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug, *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **2**(5), 115-119 (2014).
17. Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP 30, NF 25, The United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2007, Vol. 2.
18. S. Lutoti, P. Okwany, C.O. Ajayi, J. Oloro, Formulation and standardization of herbal medicinal products: A review of the formulation considerations, quality control and safety of herbal products, *J. Pharm. Drug Res.*, **3**(3), 373-381 (2020).
19. World Health Organization (WHO), *Medicina tradicional: definiciones*. URL: [https://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/), Consultado en septiembre de 2019.
20. European Medicines Agency (EMA), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), *Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products*, EMA, London, 2018.
21. M. Wichtl, *Herbal Drugs Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, Medpharm Scientific Publisher, Stuttgart, 2004.
22. B. Lockwood, The quality of commercially available nutraceutical supplements and food sources, *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**(1), 3-10 (2011).
23. Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin. Med.*, **13**, 20 (2018).
24. A.R. Abubakar, M. Haque, Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, **12**(1), 1-10 (2020).
25. Ministerio de Salud y protección Social, Decreto 2266, República de Colombia, Diario Oficial No. 45.610 (15 de julio de 2004).
26. Ministerio de Salud y Protección Social, Decreto 3553. República de Colombia, Diario Oficial No. 45.716 (29 de octubre de 2004).
27. Ministerio del Interior y de Justicia, Decreto 4927, República de Colombia, Diario Oficial No. 47566 (17 diciembre de 2009).
28. Ministerio de Salud y Protección Social, Decreto 1156, República de Colombia, Diario Oficial No. 50646 (6 de julio de 2018).

29. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, República Federativa de Brasil, (13 de maio de 2014).
30. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diretoria Colegiada Resolução - RDC N° 235, República Federativa de Brasil, Diário Oficial (20 de junho de 2018).
31. Ley General de Salud Reglamento de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios, Artículos 17 bis, 17 bis 1, 17 bis 2, y reforma de los artículos 313, Estados Unidos Mexicanos, Diario Oficial de la Federación (13 de abril de 2004).
32. U.S. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration (FDA), *Botanical Drug Development Guidance for Industry*, Department of Health and Human Services, Rockville MD, 2016.
33. A.Y. Saldarriaga, *Revisión crítica y análisis comparativo de los requerimientos normativos para la autorización de comercialización de productos naturales en diferentes países*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., 2014.
34. C.P. Nobre, F.N. Raffin, T.F. Moura, Standardization of extracts from *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) by total flavonoids content determination, *Acta Farm. Bonaerense*, **24**(4), 562-566 (2005).
35. D.A.C. Cusinato, E.Z. Martinez, M.T.C. Cintra, G.C.O. Filgueira, A.A. Berretta, V.L. Lanchote, E.B. Coelho, Evaluation of potential herbal-drug interactions of a standardized propolis extract (EPP-AF<sup>®</sup>) using an *in vivo* cocktail approach, *J. Ethnopharmacol.*, **245**, 112174 (2019).
36. N.G. Bisset, Herbal drugs and phytopharmaceuticals, en: M. Wichtl (editor), *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 2004, pp. 337-339.
37. P. Chirag, S. Tyagi, P. Kanu, P. Tushar, P. Harnish, P. Priyanka, Standardization of Herbal Medicine: A Concise Review, *J. Pharm. Biol. Res.*, **2**(1), 97-101 (2014).
38. R.K. Bijauliya, S. Alok, D.K. Chanchal, M.A. Kumar, A comprehensive review on standardization of herbal drugs, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **8**(9), 3663-3677 (2017).

39. N.R. Ekka, K.P. Namdeo, P. Kumar, Standardization Strategies for Herbal Drugs-An Overview, *Res. J. Pharm. Technol.*, **1**(4), 310-312 (2008).
40. N.P. Yadav, V.K. Dixit, Recent approaches in herbal drug standardization, *Integr. Biol.*, **2**(3) 195-203 (2008).
41. S.C. Mishra, R. Panda, O.P. Rout, Importance and Scope of Standardization of Drugs in Indian Medicine, *Int. J. Pharm. Pharm. Res.*, **4**(1), 58-61 (2014).
42. European Medicines Agency (EMA), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Committee for medicinal products for human use (CHMP), Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP), *Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products /traditional herbal medicinal products*, EMA, London, 2010, 18 p.
43. M. Heinrich, Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **80**(1), 62-66 (2015).
44. R. Kumar, M. Kotecha, A review on the standardization of herbal medicines, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **7**(2), 97-106 (2016).
45. World Health Organization (WHO), *Quality Assurance of Pharmaceuticals: A Compendium of Guidelines and Related Materials, Good Manufacturing Practices and Inspection*, WHO, Geneva, 1996.
46. World Health Organization (WHO), *Quality control methods for herbal materials*, WHO, Geneva, 2011.
47. P. Hariharan, Medicinal plants and its standardization – A global and industrial overview, *Glob. J. Med. Plant. Res.*, **1**, 10-13 (2012).
48. S.G. Patil, A.S. Wagh, R.C. Pawara, S.M. Ambore, Standard tools for evaluation of herbal drugs: An overview, *Pharma. Innov.*, **2**(9), 60-65 (2013).
49. European Pharmacopoeia Council of Europe (Ph Eur). Ed. 8, *Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)*, Strasbourg, 2013, Vol. 2.
50. O. Camacho, *Contribución a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú) a escala de laboratorio*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, 2014.
51. Farmacopeia Brasileira, 5ª Ed., Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria y Fundación Oswaldo Cruz, Brasília, 2010, Vol. 2.

52. World Health Organization (WHO), *Guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines*, WHO, Geneva, 2003.
53. C. Guerra, C. Alfaro, T. Palazón, Z. Ramos, R. Rodríguez, C. Cabezas, C. Acosta, M. Reyes, Desinfección química de plantas medicinales II: *Plantago lanceolata* L., *Rev. Cubana Plantas Med.*, **7**(3), 131-134 (2002).
54. P. Manzano, M. Quijano, I. Chóez, A. Barragán, R. Viteri, D. Martínez, C. Camacho, M. Miranda, Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves, *Rev. Fac. Nac. Agron.*, **71**(3), 8617-8622 (2018).
55. N. Choudhary, B.S. Singh, An overview of advances in the standardization of herbal drugs, *J. Pharm. Educ. Res*, **2**(2) 55-70 (2011).
56. A. Bandoni, Evaluación farmacopeica de la calidad de drogas vegetales y productos relacionados. Estado actual en las farmacopeas argentina y brasilera, *Dominiguezia*, **27**(2) 35-56 (2011).
57. H. Cabrera, F. Morón, M. Amador, A. García, L. Acosta, Phytochemical composition of fresh aerial parts of *Phania matricarioides*, *Rev. Cubana Plantas. Med.*, **17**(3) 268-278 (2012).
58. P. Nikam, J. Kareparamban, A. Jadhav, V. Kadam, Future trends in standardization of herbal drugs, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2**(6), 38-44 (2012).
59. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), *Guideline on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Substances, Herbal Preparations, and Herbal Medicinal Products / Traditional Herbal Medicinal Products*, EMA, London, 2011.
60. K. Meza, G. Geoconda, *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus) (DC) STAPE, Poacea en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica*, Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, 2013.
61. O.G. Bhusnure, S. Suryawanshi, S. S. Vijayendra, S.B. Gholve, P.S. Girm, M.J. Birajdar, Standardization and quality evaluation of herbal drugs, *J. Drug. Deliv. Ther.*, **9**(3), 1058-1063 (2019).
62. D.G. Watson, *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, Elsevier, Glasgow, 1999.

63. B. Archana, K. Anubha, Standardization of herbal drugs: An overview, *Int. Res. J. Pharm.*, **2**(12), 56-60 (2011).
64. K. Das, R.K.S. Tiwari, D.K. Shrivastava, Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends, *J. Med. Plant. Res.*, **4**(2) 104-111 (2010).
65. M. Bimakr, R.A. Rahman, F.S. Taip, A. Ganjloo, L.M. Salleh, J. Selamat, I.S.M. Zaidul, Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves, *Food Bioprod. Process*, **89**, 67-72 (2011).
66. S.S. Belokurov, I.A. Narkevich, E.V. Flisyuk, I.E. Kaukhova, M.V. Aroya, Modern extraction methods for medicinal plant raw material (Review), *Pharm. Chem. J.*, **53**(6) 559-563 (2019).
67. A. Arceusz, M. Wesolowski, P. Konieczynski, Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review, *Nat. Prod. Commun.*, **8**(12), 1821-1829 (2013).
68. A. Gupta, M. Naraniwal, V. Kothari, Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts, *Int. J. Appl. Nat. Sci.*, **1**, 8-26 (2012).
69. H. Olivo, M. Parra, *Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de Ishpink, Ocotea quixos (Lam.) kostern*, Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, 2017.
70. A.J. Harborne, *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall, New York, 1998.
71. P.H. List, P.C. Schmidt, *Phytopharmaceutical Technology*, Hyden & Son Limited, London, 1989.
72. K. Patra, S. Pareta, R. Harwansh, J. Kumar, Traditional approaches towards standardization of herbal medicines, *J. Pharm. Sci. Technol.*, **2**(11), 372-379 (2010).
73. J.N. Eloff, D.T. Ntloedibe, R. van Brummelen, A simplified but effective method for the quality control of medicinal plants by planar chromatography, *Afr. J. Tradit., Complement Altern. Med.*, **8**(5), 1-12 (2011).
74. R. Braz, L.G. Wolf, G. Lopes, J.C. Mello, Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **22**(5), 1111-1118 (2012).

75. J.L. De Souza, W.V. Da Silva, I. Ferraz, M. Assunção, L. Lira, Chemical profiles by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography of plant species from Northeast Brazil, *Pharmacogn. Mag.*, **14**(56), 437-443 (2018).
76. S. Niharika, P. Manchikanti, S. Dey, Herbal drugs: Standards and regulation, *Fitoterapia*, **81**(6), 462-471 (2010).
77. M. Rajani, N. Kanaki, Phytochemical standardization of herbal drugs and polyherbal formulations, en: K. Ramawat, J. Merillon (editors), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Springer, Berlin, 2008, pp. 349-369.
78. N.J. Lazarowych, P. Pekos, Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: Strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products, *Drug. Inf. J.*, **32**(2), 497-512 (1998).
79. D.A. Frommenwiler, A. Booker, R. Vila, M. Heinrich, E. Reich, S. Cañigüeral, Comprehensive HPTLC fingerprinting as a tool for a simplified analysis of purity of ginkgo products, *J. Ethnopharmacol.*, **243**, 112084 (2019).
80. R. Aburrá, *Evaluación y control de los impactos generados por sustancias y residuos no convencionales*, C.I.S.A. Grupo Editorial Encuentro, Córdoba, 2007.
81. D. Marcano, M. Hasegawa, *Fitoquímica orgánica*, Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, 2002.
82. A. Blainski, T. Antonelli-Ushirobira, G. Godoy, E. Leite-Mello, J. Mello, Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for galocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium Brasiliense*, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **27**(2) 162-169 (2017).
83. International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of analytical procedures: Methodology, ICH-Q2B*, ICH, Geneva, 1996.
84. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods*, FDA, Rockville, 1994.
85. G. Szepesi, M. Gazdag, K. Mihályfi, Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. III. Method validation, *J. Chromatogr.*, **464**(2), 265-278 (1989).

86. E. Montpart, P. Martín, Las Conferencias Internacionales de Armonización y el *Common Technical Document* (ICH - CTD), *OFFARM*, **22**, 118-126 (2003).
87. V. Ravichandran, S. Shalini, K. Sundram, R. Harish, Validation of analytical methods-Strategies & importance, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2**(3), 18-22 (2010).
88. World Health Organization (WHO), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, WHO, Geneva, 2005.
89. R. Rathod, R.R. Chandak, Review on “Standardization an Important Tool for Herbal Drug Development”, *J. Drug. Deliv. Ther.*, **9**(6), 253-257 (2019).
90. N.H. Anderson, Photostability testing: Design and interpretation of tests on drug substances and dosage forms, en: H.H. Tonnersons (editor), *The Photostability of Drugs and Drug Formulations*, Taylor & Francis, London, 1996, pp. 305–321.
91. L. Thakur, U. Ghodasra, N. Patel, M. Dabhi, Novel approaches for stability improvement in natural medicines, *Pharmacogn. Rev.*, **5**(9), 48-54 (2011).
92. T. Rawat, I.P. Pandey, Forced degradation studies for drug substances and drug products- scientific and regulatory considerations, *J. Pharm. Sci. & Res.*, **7**(5), 238-241 (2015).
93. World Health Organization (WHO), *Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*, WHO, Geneva, 2017.
94. G. Bansal, N. Suthar, J. Kaur, A. Jain, Stability testing of herbal drugs: Challenges, regulatory compliance and perspectives, *Phytother. Res.*, **30**(7), 1046-1058 (2016).
95. S.K. Baveja, S. Singh, Thin-layer chromatographic examination of the degradation of centbucridine in aqueous solutions, *J. Chromatogr.*, **396**, 337-344 (1986).
96. S. Singh, M. Bakshi, Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs, *Pharm. Technol.*, **4**, 1-14 (2000).

### COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

W.L. Villarreal-Romero, J.E. Robles-Camargo, G.M. Costa, Estado del arte en la estandarización de extractos vegetales, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 842-867 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110745>