UNIVERSIDAD CENTRAL DE LAS VILLAS
FACULTAD QUIMICA-FARMACIA

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE LICENCIADO EN CIENCIAS FARMACEUTICAS.

CARACTERIZACION TECNOLOGICA Y ANALITICA DE LOS SOLIDOS PULVERULENTOS Y GRANULADOS DEL PARTHENIUM HYSTEROPHORUS LINN.

AUTOR: YADIRA PADRÓN.

TUTORES: MSC. MIGUEL A. ALBA DE ARMAS.
MSC. YANELIS SAUCEDO HERNANDEZ

2004

RESUMEN.

En el presente trabajo se realizó un estudio del *Parthenium hysterophorus,* **Linn** *(*escoba amarga), con vistas a la obtención de una forma de dosificación sólida oral, de uso antiparasitario. Se evaluó la influencia en la degradación del sólido pulverulento de factores tales como: humedad y luz, desarrollando la evaluación física y química del extracto, empleando como técnica analítica la Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC) en la determinación del contenido de su principal ingrediente activo (partenina). La luz y la humedad resultaron ser factores que afectan la estabilidad de los sólidos pulverulentos, de acuerdo a la evaluación química realizada. Tomando como base las deficientes propiedades físico – químicas y tecnológicas de los sólidos pulverulentos, demostrada en trabajos precedentes, se elaboraron granulados usando como aglutinantes Eudragit L 20% y acetoftalato de celulosa 15%. Los granulados confeccionados se caracterizaron tecnológicamente, demostrando mejoras significativas de sus propiedades físico – químicas y tecnológicas con respecto a los sólidos pulverulentos . El granulado elaborado con el extracto seco al 30% y el Eudragit L al 20% como agente aglutinante resultó ser el que mejores ventajas ofrece para ser utilizado como una forma farmacéutica sólida de dosificación oral. Como resultado novedoso de la investigación, se logra la obtención de una forma de dosificación oral de uso antiparasitario, caracterizada tecnológicamente y evaluada desde el punto de vista físico- químico, con vistas al control de la calidad de dicha forma farmacéutica.

Palabra claves: *Parthenium hysterophorus,* HPLC, granulados, Eudragit L, acetoftalato de celulosa.

INTRODUCCION.

> La medicina verde se desarrolló en las comunidades antiguas con la preparación de pociones y recetas curativas para todo tipo de males. Los conocimientos adquiridos en la práctica por " Ensayo y error " aún los más elementales, fueron transmitiéndose de hechicero a aprendiz, o de padre a hijo y de este a sus nietos, generación tras generación hasta llegar a nuestros días (1)

La utilización de las plantas medicinales como una alternativa médica más, llegó a convertirse en práctica de reconocido valor para el tratamiento de un gran número de enfermedades, incluso en países desarrollados. Pero lamentablemente la exaltación del poder curativo de los fármacos sintéticos y la comodidad con que pueden ser administrados y dosificados, nos induce a rechazar el vegetal fresco por la píldora de Vitamina C y el cocimiento de hojas, por el jarabe de sabor a fresa o el comprimido de brillantes colores, sin tener en cuenta que existen muchos casos en los que la medicina verde proporciona remedios tan buenos o mejores y con menos efectos secundarios que los productos sintéticos que se expenden en la farmacia (1).

En nuestro país se ha retomado el uso de la medicina natural como recurso terapéutico debido a su probada efectividad e inocuidad así como por razones económicas. El *Parthenium hysterophorus* Linn (escoba amarga) es una de las plantas medicinales más ampliamente distribuidas en nuestro archipiélago y como presenta un gran número de acciones terapéuticas entre las que se destacan: antipirética, hipostenizante gástrico, tónico y estimulante estomacal, antiprurítico, **antiparasitario**, antineurálgica, entre otras; surge la necesidad, una vez lograda su estandarización como droga, de realizar estudios tecnológicos y analíticos que permitan, el diseño y evaluación de una forma farmacéutica oral que contenga el extracto seco de la planta, garantizando los requisitos de calidad, seguridad y eficacia.

Por ello, en el presente trabajo se propone los siguientes objetivos:

Objetivos generales:

1- Realizar estudios de preformulación y formulación de una forma sólida de dosificación oral a partir de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus* Linn.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la influencia de la luz y la humedad en la estabilidad física y química de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* Linn.
2. Elaborar y caracterizar tecnológicamente los granulados obtenidos a partir de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* Linn.

I. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1.1 Aspectos generales de la planta.

1.1.1 Nombres vernáculos: Artemisilla, en Oriente se le llama confitillo, en Occidente se le denomina Escoba amarga (2,3 y 4); en Puerto Rico es conocida como ajenjo cimarrón, Artemisa, Santa María y yerba amarga; en Estados Unidos y las Antillas Inglesas se le conoce por el nombre de feberfew, mugwort; y en Venezuela es llamada botonera(4).

1.1.2 Familia a la que pertenece: Familia compuesta; tribu: tubulifloras (5).

1.1.3 Origen y distribución geográfica.

La planta es oriunda de América del Norte, América Central y el oeste de la India. Los primeros recortes de ella se dieron a conocer en 1956, aunque pequeñas referencias datan de medio siglo atrás (6).

También crece en las Antillas Mayores y en algunas de las menores, las Bermudas, el sur de los Estados Unidos y en América tropical continental (4).

En nuestro país es una de las yerbas más comunes y abundantes, particularmente en los terrenos colorados, donde forma extensos macizos en los caminos y en terrenos yermos y cultivados; así como en tierras fértiles y llanos de toda la isla(3,4,7 y 8).

1.1.4 Descripción botánica: Es una yerba anual estringosa-pubescente o un tanto vellosa, comúnmente muy ramificada, de 30 a 70 cm de altura. Las hojas son alternas de contorno aovado a oblongo, delgadas y flácidas. Inflorescencia en cabezuelas corimbosas ó paniculadas, numerosas de 5 a 6 mm de ancho. Las flores de la periferia son escasas, con las lígulas reniformes, blancas como de 1mm de ancho (2 y 4).

1.1.5 Partes de la planta empleadas: Toda la planta.

1.1.6 Usos en la medicina tradicional.

En Cuba se usa como remedio casero contra la fiebre (2, 4 y 5) y en baños contra los granos (4).

En la ciénaga y península de Zapata se utiliza para inmunizarse contra el Paludismo y en Camagüey se emplea para enfermedades del pecho (4).

Se considera hiposterizante gástrico, tónico y estimulante estomacal. También el zumo es útil contra las úlceras tuberculosas y sifilíticas. Se utiliza además contra la diabetes y cólicos nefríticos (4).

La decocción o el polvo de la planta aplicada en ungüentos da resultados positivos contra herpes, sarna y tiña (4 y 9).

Otras propiedades atribuidas son: corroborante vermífuga, antiparasitaria, contra las afecciones gastrointestinales, del hígado, de los nervios, y antiprurítica (7 y 10).

Además tiene la propiedad de ser antineurálgica (4, 11 y 12) y antidisentérica (13).

En Argentina se emplean las partes aéreas de la planta, secas, realizando una extracción con agua caliente y se administran en adultos por vía oral como emoliente para las mordeduras de las serpientes, como tónico del mal sabor, como abortivo y para trastornos hepáticos (11, 14 y 15).

En México se utilizan las flores y hojas en una extracción con agua caliente administrada por vía oral, en mujeres adultas como emenagoga (4).

En Haití se hace una extracción con agua de las hojas secas y se aplican externamente en adultos para afecciones cutáneas (16).

En Puerto Rico las hojas y los tallos en extracción con agua caliente, se administra por vía oral en adultos para combatir la fiebre (17).

En la India se utiliza la planta entera seca realizando una extracción con agua caliente, administrada por vía oral, en humanos adultos, como disentérico, tónico, febrífugo, contra neuralgias y para estimular la función menstrual (18). Las hojas frescas, en una extracción con agua, es administrada por vía oral para las inflamaciones incluyendo las enfermedades venéreas provocadas por esporas (19). También en dicho país se aplica la raíz de la planta para aliviar el dolor de la picadura de las avispas (20). Además se usa para tratar úlceras enrojecidas, tratamiento de heridas, anemia y en ciertas enfermedades de la piel (21).

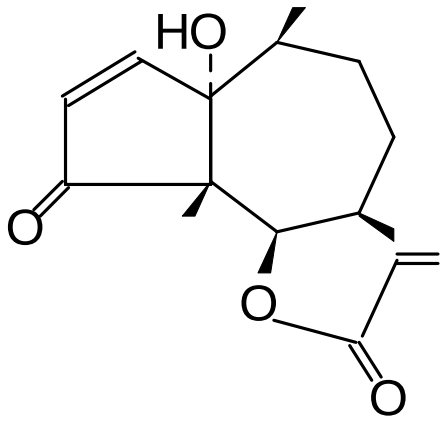
1.1.7 Composición química.

- Lactonas sesquiterpénicas como la partenina (22).
- Hysterina , coronofilina , caryofilina (23).
- Lactonas monoterpénicas como limoneno y pineno (22).
- Esteroides como campesterol , estigmasterol , beta – citosterol (11,22,23 y 24).

- Flavonoides (11).
- Derivados de flavonoides como la quercetina , quercitrina , quercetagetina , kaempherol (22,23 y 24).
- Alcaloides (11 y 22).
- Carbohidratos (11 y 25).
- Compuestos inorgánicos (25).
- Alcanos (18 y 25).
- Lípidos (11 y 26).
- Misceláneo (27).
- Saponinas , aminoácidos , taninos y quinonas (10).

Se plantea que la partenina es el principio activo que está presente en el *Parthenium hysterophorus* Linn (2, 3, 12 y 24). Este componente es una lactona sesquiterpénica con esqueleto de pseudoguayano; y en este sentido se destacan tres tipos de lactonas: xantonólidas , partenólidas y ambrosanólidas , grupo al que pertenece la partenina (28 y 29)
Las lactonas sesquiterpénicas se encuentran generalmente en las flores y partes aéreas de la planta .Son sustancias amargas y casi todas presentan propiedades citotóxicas, por la presencia en la estructura del grupo exometilenbutenólido (28).

Ella presenta la siguiente estructura:



1.1.8 Actividad biológica.

a) Actividad biológica de los extractos.

El extracto etanólico de la droga cruda al 50% de las flores demostró poseer actividad trypanocidal in vitro en concentraciones de 5, 50, 500 y 1000ug / ml. In vitro ejerció un efecto antitrypanosomal a dosis de 100 y 300 mg / kg de peso reduciendo la paracitemia media en 3, 4, 5, y 6 días comparándolo con un grupo control (30).

Se ha reportado que el extracto metanólico de las flores de la planta tiene efecto antitumural en huéspedes que presentan leucemia linfocítica transplantable. El efecto fue sustentado por autopsias bioquímicas relacionadas con el nivel de glutation , contenido de citocromo P 450, glutation transferasa y UDP- glucouroniltransferasa en el tejido hepático de las células del huésped (31) .

En la India el aceite esencial, en concentraciones no especificadas, resultó activo sobre placas de agar, demostrando actividad antibacteriana en Bacillus anthracis, Bacillus subtilis , corynebacterium pyogenes, klebsiella species, Proteus vulgaris, Pseudomona aeruginosa , Salmonellas newport, staphylococcus aureus (32) .

En nuestro país se trabajó con extractos de las partes verdes de la planta para demostrar la actividad antiparasitaria en ganado demostrando que tiene buena efectividad contra nemátodos hematófogos de los rumiantes (33), así como la técnica de aurícula aislada a animales de laboratorio (cobayo) para demostrar la actividad cardiotónica de la planta utilizando extractos de las hojas y las raíces a una concentración de 20g en 100 mililítros de agua y los resultados fueron negativos (34).

A concentraciones sin diluir el aceite esencial originó actividad antifúngica sobre Alternaria species, Aspergillus cándidas, Aspergillus flavus, aspergillus fumigatus, Microsporum gypseum , Penicilium digitatum y Rhizopus nigricaus (35) .

b) Actividad biológica de la partenina.

La partenina presenta actividad antibacteriana al realizar el método de difusión en discos de papel de filtro, demostró tener actividad inhibitoria in vitro contra bacterias gram negativas y en un caso contra bacterias gram positivas (12).

La planta presenta un compuesto llamado pyrethrins que es amebicida a dosis de 125 mg/ml comparándolo con el metronidazol cuyo valor es de 8 mg/ml (36).

También demostró tener actividad efectiva en cultivos tanto axénicos como polyxénicos de la Entamoeba hstolytica. La concentración mínima inhibitoria in vitro de la partenina fue 12,5 ug/ml comparable con el metronidazol (10 – 12,5 ug/ml). In vivo resultó ser menos efectiva que el fármaco. La dosis que logró un 100% de efectividad y 0% de mortalidad fue 30 mg/kg (13).

1.1.9 Toxicidad.

La planta es tóxica para toros y búfalos. Los animales desarrollan dermatitis a concentraciones no identificadas y al realizarse las autopsias revelaron ulceración en el tracto alimentario así como cambios patológicos en el hígado, riñón y piel (37).

En el caso de las personas también causa severas dermatitis ya sea por contacto directo o indirecto que después de una larga exposición se pueden volver crónicas, la fuente de la epidemia se considera que sean las lactonas sesquiterpénicas de manera tal que el polvo fino es arrastrado por el viento y provoca esta patología (19, 24, 38, 39, 40 y 41). El principal agente etiliológico , se considera que sea la partenina (12, 16, 42 y 43) .

Otra de las manifestaciones tóxicas que ha sido reportada es la rinitis alérgica (44, 45, 46 y 47). Estudios preliminares han revelado a una proteína de 31 Kd como el mayor alergeno en el polen de la planta (48). Además se detectó una inmunoglobulina IgE específica a la planta en los pacientes aquejados (45).

Las plantas de la familia Compositae entre las que se encuentra la Escoba amarga provocan toxicidad a nivel del sistema nervioso central, provocando temor, alucinaciones, crisis epiléptica, sobre todo si el material vegetal es utilizado por un largo período de tiempo (49).

Dentro de los factores que influyen en la agudización de la cirrosis hepática infantil en la India, se piensa mediante un estudio que se realizó en animales que el consumo de la planta sea un posible agente causal del aumento de las concentraciones de cobre hepático en los niños que consumen la leche de estos animales (50).

La partenina inhibe el estado 3 de la respiración y estimula el estado 4 en el hígado de la rata y mitocondrias del riñón así como la actividad de la ATPasa en presencia de iones magnesio. Esta propiedad indica que la acción tóxica de la partenina puede estar relacionada a su interferencia en la fosforilación oxidativa (51).

1.2 Aspectos tecnológicos.

1.2.1 Granulados.

1.2.1.1Generalidades.

Los granulados no son más que un conjunto de partículas unidas lo que hace posible aumentar la fluidez de la masa, al disminuir el área de superficie específica y por tanto la fricción entre las partículas. Además se aumenta la compresibilidad, aspecto importante en la elaboración de tabletas y cápsulas. (52).

La unión interparticular que dará lugar al granulado se consigue mediante dos sistemas:

- Presencia de aglutinante.
- Acción mecánica que une a los gránulos entre sí por efecto de una presión ó fuerza.

En el primer caso se necesita de un líquido que una al aglutinante con las sustancias que desean granularse, en este caso se denomina granulación por vía húmeda que a su vez puede ser acuosa en el caso de que el líquido sea agua ó anhidra si el líquido es un solvente orgánico. En el segundo caso se lleva a cabo mediante la aplicación de una fuerza ó presión dada por una máquina de comprimir sin necesidad de adicionar una sustancia aglutinante, entonces el proceso recibe el nombre de granulación por vía seca. (53)

El método de granulación húmeda es muy usado porque produce gránulos de alta compresibilidad, aumenta considerablemente loa velocidad de flujo en principios activos de alta dosificación y baja fluidez, mejora la uniformidad de contenido en principios solubles de baja dosificación ó coloreados y prevé la segregación de masa sólida al uniformar el tamaño de partículas. Existen diferentes formas de granular por esta vía, entre las que se encuentran la elaboración industrial convencional, la industrial en lecho fluido y la magistral (53)

La cantidad óptima de aglutinante hace posible que se obtenga un tamaño adecuado del gránulo, disminuyéndose la cantidad de polvo fino presente y se logra que el granulado cuente con buena resistencia mecánica. (52). Una forma práctica de determinarla consiste en tomar una porción de la masa humectada sobre la palma de la mano y presionarla cerrando esta; al abrir la mano debe quedar toda la masa en un cuerpo sobre el cual queden marcados

los dedos, además al aplicar un golpe de canto con la otra mano dicho cuerpo debe dividirse en dos partes limpiamente (52 y 54).

En la granulación húmeda magistral se realiza primeramente la granulación para convertir la masa en agregados de partículas, incrementar los puntos de contacto entre ellas y aumentar el área de superficie para facilitar el secado. Después se realiza el secado para eliminar el solvente que fue utilizado en la formación de los agregados y reducir el contenido de humedad a un nivel óptimo. Por último se efectúa la reglanulación para darle tamaño al grano y romper cualquier aglomerado de gránulos que haya quedado después del secado (52 y 54).

Entre los materiales que se utilizan comúnmente como aglutinante se encuentran el almidón, la gelatina, azúcares y sucrosa, glucosa, dextrosa, melaza y lactosa. También están las gomas naturales y sintéticas como la acacia, alginato de sodio, extracto de musgo irlandés, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, entre otros (55).

1.2.1.2 Evaluación de las propiedades tecnológicas de los granulados.

Una vez elaborados los granulados se deben evaluar sus propiedades físico – químicas y tecnológicas, para ver si reúnen las condiciones adecuadas para su compresión y formación de tabletas, su encapsulación o para utilizarse como granulados propiamente dicho. Entre las pruebas que se realizan tenemos las siguientes: análisis granulométrico, humedad residual, densidad aparente, densidad real, porosidad, velocidad de flujo, ángulo de reposo y friabilidad granular.(52)

1.2.1.3 Métodos para evaluar las propiedades de flujo.

Existen cuatro métodos, ellos son:

a) Métodos angulares: Son los más sencillos y consisten en analizar las características de un montón formado sobre una superficie horizontal; destacándose entre ellos la determinación del ángulo de reposo.(52)
b) Métodos que caracterizan el flujo a través de orificios: Consisten en determinar el tiempo en que tarda en descargar una cantidad de sólido pulverulento a través de un embudo ó bien pesar la cantidad descargada , obteniendo valores de velocidad (56)
c) Métodos basados en la determinación de la fuerza de cizalla.(56)

d) Métodos de compactación. En ellos hay que tener presente que la compresibilidad es la capacidad de una masa de polvo de reducir su volumen; para determinarlos se somete el producto en un recipiente de dimensiones conocidas a un golpeteo, en condiciones estandarizadas y se determinan las reducciones de volumen que resultan del golpeteo, tomando mediciones del volumen inicial y final, se va adicionando masa a medida que se golpea hasta un volumen fijado y se va pesando (56).

1.2.1.4 Formulación y evaluación de granulados del *Parthenium hysterophorus* Linn.

León (57), en el año 1999, desarrolló un estudio de preformulación e inició la formulación de una forma sólida de dosificación a partir de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus* **Linn**., obteniendo como resultados significativos los siguientes:

- Se obtuvo la droga seca con la calidad requerida como materia prima para uso farmacéutico.

- Las propiedades tecnológicas de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* Linn tales como el análisis de distribución del tamaño de partícula, densidad aparente, densidad real, porosidad, ángulo de reposo y velocidad de flujo resultaron ser deficientes.

- La humedad resultó ser un factor que afecta la estabilidad y la fluidez de los sólidos pulverulentos.

- El granulado que se elaboró con un tamaño de partícula 0.4 mm y utilizando gelatina como aglutinante ofrece las mejores características tecnológicas para su incorporación en una forma farmacéutica sólida.

- Las cápsulas elaboradas cumplen con las especificaciones establecidas para las mismas, teniendo en cuenta las pruebas de control de la calidad que les fueron realizadas.

1.3 Consideraciones en la estabilidad en los medicamentos.

1.3.1 Definición de estabilidad.

Se define como la extensión en que un producto mantiene entre unos límites específicos y durante su período de validez, las mismas propiedades y características que poseía el medicamento en el momento de la elaboración (47)

1.3.2 Factores que inciden en la estabilidad de un medicamento.

- Existencia de alguna incompatibilidad física ó química entre los componentes activos ó auxiliares (58).
- Circunstancias del ambiente en las que se va a conservar el medicamento; principalmente el calor, el aire, la humedad, la luz y los microorganismos. Estos agentes actuarán de forma diferente según el medicamento sea sólido ó líquido y según su grado de aislamiento del exterior. Además existen sinergismos de acción entre ellos; la humedad porosa, aparte de su propia acción hidrolizante favorece las demás reacciones, principalmente las de oxidación y otras acciones catalíticas de algún componente; su presencia conlleva al desarrollo de microorganismos. El aire además de oxidante elimina las esencias y otros productos volátiles; el calor favorece las alteraciones químicas con velocidades que frecuentemente oscilan entre el doble y el triple por cada 10 ° C de aumento; la luz acelera igualmente reacciones que en su ausencia se producirían con ínfima velocidad (58).

La alteración de un medicamento se debe fundamentalmente a:

a) Inestabilidad física, que afecta a las características físicas de los medicamentos.
b) Inestabilidad química, donde a través de una reacción química del tipo que sea se degrada la parte activa de una sustancia medicamentosa y aparecen los productos de descomposición. La finalidad de su estudio es conocer el tiempo mediante el cual puede utilizarse el medicamento sin detrimento significativo de su actividad terapéutica (58).
c) Inestabilidad biológica, que implica una alteración del medicamento debido al desarrollo microbiano, y constituye, en ocasiones, el producto de partida de algunas de las modalidades de inestabilidad que anteceden (58).

1.3.3 Vías para lograr la estabilización de los medicamentos.

- La destrucción de enzimas se consigue mediante la acción del calor, pero en algunas ocasiones, habrá que acudir a procedimientos de precipitación o extracción de los principios activos (58).
- La actividad microbiana se puede anular por esterilización o adición de conservadores antisépticos (58).
- Para la eliminación de productos responsables del proceso destructivo puede añadirse conservadores antioxidantes o sustituir el aire por gas inerte cuando se trata del oxígeno, o acudir para el caso de la presencia perjudicial del agua, a los procedimientos de desecación (58).
- Pueden modificarse determinados factores de alteración de los medicamentos (pH, temperatura y luz) añadiendo soluciones reguladoras del pH , enfriando ó preservando de las reacciones actínicas (58) .
- El acondicionamiento o embalaje de los medicamentos es importante pues los protege de los agentes perjudiciales exteriores. En este aspecto hay que tener en cuenta la elección del recipiente, así como el cierre adecuado. Las materias con las que se fabrican los recipientes, así como las envolturas con las que se protegen de los agentes exteriores son : vidrio, plásticos, elastómeros, papeles, cartones y metales (58) .

1.4 Consideraciones analíticas.

I.4.1 Cromatografía liquida de alta precisión (HPLC).

La cromatografía es un método de separación el cual depende para su eficiencia de la distribución de equilibrio de las moléculas de soluto entre dos fases, una estacionaria sobre la cual fluye la segunda, aquellos solutos distribuidos preferentemente en la fase móvil podrían pasar rápidamente a través del sistema. La fase estacionaria esta contenida en un tubo apropiado llamado columna, puede ser un sólido, un líquido soportado sobre un sólido o un gel y la fase móvil es bombeada (o en ocasiones fluye bajo gravedad) a través de la columna. La muestra es colocada en la punta de la columna usando un apropiado sistema de introducción de muestra y después de pasar a través de la columna los componentes separados son detectados usando un detector apropiado cuya salida se muestra en un registrador.

Esencialmente consiste en hacer pasar la fase móvil líquida constituida por un disolvente adecuado, en el que esta disuelta la muestra, a una presión muy elevada, a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Por su distinta interacción con las dos fases, las muestras son retenidas con mayor o menor intensidad, eluyendo separadas de la columna. Se puede recoger el eluyente de la columna para un análisis posterior o analizar directamente el eluyente por medio de un detector situado a la salida, que mide la variación de una determinada propiedad física del líquido (absorbancia, índice de refracción, etc.), permitiendo el registro de una serie de picos, correspondientes a las distintas fracciones que eluyen de la columna. Además se puede conocer la concentración de cada componente a partir de la altura o el área de los picos.

✓ La cromatografía líquida se puede clasificar basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación en: cromatografía de absorción, cromatografía de partición, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión. (59, 60 y 61)

En el año 2000 Saucedo (62) llevo a cabo la determinación cuantitativa de partenina en extracto de hojas de *Parthenium hysterophorus* **Linn**, mediante Cromatografía Líquida de alta precisión. (HPLC). En este caso el método usado se basa en la separación de la partenina del resto de los componentes del extracto a través de una columna para HPLC, rellena con fase estacionaria LiChrospher- 100 RP- 18, fase móvil acetonitrilo - agua en mezcla (50: 50) , flujo de 0,3 mL/ min y su detección para la cuantificación mediante detector diode array. Como resultado se obtuvo que en un volumen de inyección de 10 μL tenemos un tamaño de muestra equivalente a 0.002 g de material vegetal, el cual contiene 1.8653 μg de partenina de acuerdo a los resultados de la cuantificación efectuada, por tanto en un gramo de material vegetal hay 0.933 mg de partenina lo que corresponde aproximadamente a un 0.1% del componente. La técnica resultó lineal, precisa, exacta, sensible y específica, bajo las condiciones de trabajo establecidas.

II. MATERIALES Y METODOS.

II.1. Estudio de los factores que pueden influir en la estabilidad de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* Linn.

Materiales, utensilios y medios de medición.

- HPLC**: Buscar datos del equipo.**
- Balanza Analítica Sartorius, error 0,1 mg, LSP 200 g
- Máquina sacudidora electrónica, THYS 2
- Desecadora
- Sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* Linn.
- Cristalería de laboratorio.
- Metanol
-Cloroformo
- Acetona.
- Acido Sulfúrico98 %
- Patrón de análisis (partenina)

Método.

1.- Influencia de la Humedad

Se preparan tres ambientes de humedad relativa, al saturar las desecadoras con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4):

Humedad Relativa (%)	Concentración de H_2SO_4 (%)
47,2	48
70,4	36
97,5	10

En cada desecadora se colocan tres réplicas de cantidades pesadas de sólidos pulverulentos, exactamente, en pesafiltros, se toma el peso inicial de los mismos con los sólidos

pulverulentos; y se analiza transcurrido el tiempo de estudio (15 días) la ganancia de humedad.

a) Ganancia de Humedad.

Se determina gravimétricamente. Cada día se pesan con exactitud, las réplicas que se encuentran en los diferentes ambientes de humedad. Las pesadas se realizan hasta alcanzar un peso constante.

b) Características Organolépticas.

Se observa el comportamiento organoléptico teniendo en cuenta el olor, color y aspecto de los sólidos pulverulentos.

c) Análisis Químico.

Se aplica la técnica de determinación cuantitativa de partenina en sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* **Linn**., mediante la Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC) para determinar el contenido de su principal ingrediente activo, la partenina. (62)

Fundamento del método.

El método se basa en la separación de la partenina del resto de los componentes del extracto a través de una columna para HPLC, rellena con fase estacionaria LiChrospher- 100 RP- 18, fase móvil acetonitrilo - agua en mezcla (50: 50) , flujo de 0,1 mL/ min y su detección para la cuantificación mediante detector de arreglo de diodos, a una λ= 272 nm.

Preparación de la solución patrón de partenina. (0.1 mg/mL).

Se pesan con exactitud 1.000 mg, se introducen en un matraz aforado de 10 mL y se adiciona acetona hasta completar volumen obteniéndose una solución de concentración de 0.1 mg/ mL.

Preparación de la solución patrón de partenina. (0.01 mg/mL).

Se toma una alícuota de 1 mL de la solución patrón de partenina 0.1 mg/mL y se evapora el solvente, el residuo es disuelto en metanol y llevado a un matraz aforado de 10 mL, completándose volumen con metanol. Se obtiene una solución con concentración 0.01 mg/mL.

Preparación de la muestra.

Se pesan 3.00 gr de material vegetal y se colocan en erlenmeyer con 15 mL de cloroformo, se tapa y se homogeniza en máquina sacudidora por 5 minutos. Se filtra y el filtrado es evaporado y redisuelto en 3 mL de metanol. La suspensión se filtra por miliporo y se inyecta en el equipo 10 μl de esta solución.

Procedimiento.

Se realiza la inyección de las muestras en el equipo bajo las siguientes condiciones cromatográficas :

- Fase estacionaria: LiChrospher - 100 RP- 18.
- Fase móvil: acetonitrilo - agua (50: 50).
- Flujo: 0.1mL/ min
- Detector: Arreglo de diodos.
- λ= 272 nm.

Expresión de los resultados.

La expresión de cálculo empleada para la cuantificación en el HPLC es la siguiente:

$$\frac{A_p}{C_p} = \frac{A_m}{C_m}$$

Ap: Area bajo la curva del patrón .

Am : Area bajo la curva de la muestra.

Cm : Concentración de la muestra.

Cp : Concentración del patrón.

El análisis se realiza al inicio y al final del estudio de la influencia del factor humedad.

2.- Influencia de la Luz.

Se colocan en dos desecadoras con sílica gel, tres réplicas de cantidades pesadas de sólidos pulverulentos, en frascos incoloros, bajo la influencia de la luz; y en frascos ámbar protegidos de la luz, respectivamente.

En el transcurso del tiempo (30 días) se analizan:

a) Características Organolépticas.

Se observa el comportamiento organoléptico teniendo en cuenta el olor, color y aspecto de los sólidos pulverulentos.

b) Análisis Químico.

Se realiza igual a lo que se reporta en el estudio de influencia de la humedad, pesando en este caso la cantidad exacta que se reporta en la Técnica de cuantificación.

II.2. Formulación y elaboración de los granulados.

Variantes de formulaciones ensayadas.

Extracto seco ----------30%, 40%, 50%.Componente activo.

Almidón de maíz--------- 15%. Desintegrante.

Lubricantes---------- 3%.

Lactosa c.s.p.---------- 100% Vehículo.

Se empleó como aglutinante, el Eudragit L al 20%, en acetona-isopropanol (1:1) y el acetoftalato de celulosa al 15% en etanol-acetona (3:1), ensayando por tanto un total de 6 variantes de formulaciones.

Técnica de elaboración empleada (Granulación húmeda. Método tradicional).

1- Reducir tamaño de partícula del sólido pulverulento.

2-Tamizar por tamiz de 0.2 mm.

3-Pesar las cantidades correspondientes de los componentes.

4-Mezclar extracto seco, desintegrante y vehículo .

5-Preparar la solución aglutinante.

6-Adicionar poco a poco la solución aglutinante a la mezcla de polvos,
hasta consistencia adecuada.

7- Granular por tamiz de 1.2 mm.

8- Secar en estufa a 40 grados.

9- Regranular por tamiz de 1 mm.

II.3. Caracterización tecnológica de los granulados obtenidos a partir del *Parthenium hysterophorus* Linn.

Materiales, utensilios y medios de medición.

- Vibrador de tamices, OSK 7331
- Tamices de 1, 0.85, 0.6, 0.5, 0.425, 0.3, 0.212, 0.15 mm.

- Balanza Técnica, owalabor, error 0,01 g, LSP 160 g
- Cronómetro, Slava
- granulados de ***Parthenium hysterophorus, L.***
- Cristalería común de laboratorio.

Método.

La caracterización de los granulados incluye los siguientes aspectos:

(a)Análisis granulométrico.

El análisis granulométrico se realiza por el método de tamizaje. Se pesan 50 g de la masa de granulados. Se taran los tamices escogidos y se colocan en orden decreciente de abertura de malla portando el tamiz superior la cantidad de masa pesada. Se lleva al vibrador de tamices, a una frecuencia de vibración de 7 durante 15 minutos. Seguidamente, se pesan nuevamente los tamices y se calcula la fracción retenida en cada uno. Las determinaciones se realizaron por triplicado.(52)

(b) Densidad aparente.

Se utiliza el método de la probeta. Se pesa una cantidad definida de muestra (50 g); midiendo el volumen que ocupa la misma en una probeta. El llenado se realiza por caída libre utilizando un embudo. Las determinaciones se llevan a cabo por triplicado. (52)

La densidad aparente fue determinada a través de la expresión:

$$da = \frac{m}{\frac{\sum V}{n}}$$

donde:

da - Densidad aparente (g/cm^3)

m - Masa de la muestra (g)

V - Volumen que ocupa la masa de la muestra (cm^3)

n - Cantidad de determinaciones realizadas

(c) Densidad real.

Se coloca 1 g del granulado en un picnómetro y se pesa. Se añade el solvente (agua destilada) hasta llenar el picnómetro y se vuelve a pesar.
Se calcula el volumen que ocupa el solvente por la siguiente expresión:

$$Vs = \frac{(Mp + 1g) - (Mo + 1g)}{\rho_s}$$

donde:
Vs - Volumen de solvente (cm^3)
Mp - Masa del picnómetro con solvente (g)
Mo - Masa del picnómetro (g)
ρ_S - Densidad del solvente (g/cm^3)

y la densidad real:

$$dr = \frac{1g}{Vp - Vs}$$

donde:
dr - Densidad real (g/cm^3)
Vp - Volumen del picnómetro (cm^3)
Vs - Volumen de solvente (cm^3)
Las determinaciones se realizan por triplicado.(52)
(d) Porosidad.

Se determina mediante la correlación entre la densidad aparente y la densidad real, a través de la ecuación de Martín: (52)

$$e = (1 - \frac{da}{dr}) \cdot 100$$

donde:

e - Porosidad (%)

da- Densidad aparente (g/cm^3)

dr- Densidad real (g/cm^3)

(e) Ángulo de reposo.

Es el ángulo que puede formar una muestra sólida con el plano horizontal al dejarse caer libremente a través de un embudo de vástago corto. La determinación de la altura se realiza introduciendo un fino alambre de cobre en el centro de la pirámide formada, y el radio es el resultado del promedio de las mediciones de ocho radios medidos en diferentes direcciones en la base de la pirámide formada por la muestra.

El ángulo de reposo es determinado a través de la expresión:

$$\tan \alpha = \frac{catetoopuesto}{catetoadyacente} = \frac{h}{r}$$

donde:

α- Ángulo de reposo.

h - Altura de la masa de sólidos pulverulentos (cm.)

r - Radio (cm.).

Las determinaciones se realizan por triplicado. (52)

(f) Velocidad de flujo.

Es la medida de la capacidad que tiene una masa de partículas sólidas de fluir a través de una tolva (embudo), que presenta un diámetro dado y un ángulo de inclinación de sus paredes de aproximadamente 45°. Se coloca en él una cantidad definida de muestra y se deja caer determinándose con ayuda de un cronómetro el tiempo en segundos que demoró en fluir la masa de estudio.

La velocidad de flujo es determinada a través de la expresión:

$$Vf = \frac{G}{0{,}785 \cdot d^2 \cdot t}$$

donde:

Vf - Velocidad de flujo (g/cm^2 s)

G - Masa de la muestra (g)

d - Diámetro del vástago (cm)

t - Tiempo (s)

Las determinaciones se realizan por triplicado.(52)

(g) Humedad residual.

El contenido se determinó por el método de la balanza Infrarroja, se realiza un análisis por triplicado, cada una de las muestras se somete a una radiación correspondiente a una temperatura de 105°C, se pesan 2 g en cada caso, y se distribuyen homogéneamente en el platillo de la balanza. El contenido de humedad, que se expresa en porcentaje, se determina a partir de las variaciones de peso experimentado por las mismas. Las muestras se exponen hasta peso constante.(52)

III. RESULTADOS Y DISCUSION.

III.1. Estudio de los factores que pueden influir en la estabilidad de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* Linn.

Influencia de la humedad:

a) Ganancia de humedad:

A continuación se muestran los resultados de la ganancia de humedad de los sólidos pulverulentos de ***Parthenium hysterophorus* Linn.**

TABLA 1. Ganancia de humedad de los sólidos pulverulentos a los 15 días en diferentes ambientes de humedad relativa.

Humedad Relativa (%)	Ganancia de Humedad (%)
47,2	0.2076
70,4	0.4053
97,5	6.2228

Como puede observarse a medida que aumenta la humedad relativa, aumenta a su vez la ganancia de humedad de los sólidos pulverulentos, lo que da una medida de su alta higroscopicidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por León en el 1999**.** (57)

b) Características organolépticas.

Transcurrido el tiempo de estudio (15 días), no se apreciaron variaciones notables de dichos caracteres.

c) Análisis químico.

Los resultados obtenidos en la cuantificación del principal ingrediente activo en los sólidos pulverulentos a tiempo cero (t_0), coinciden con el contenido reportado para el componente por Acosta y García (63), correspondiente a 0.1 %, de acuerdo a la época de recolección de la planta y de las características del suelo predominante.

El contenido de la lactona sesquiterpenica en los 3 ambientes de humedad evaluados disminuyó, apreciándose una disminución significativa de la concentración de partenina en

el material vegetal, a medida que se incrementó el % de humedad relativa, como se puede observar en la siguiente tabla.

TABLA: 2. Valores medios de la concentración de partenina (%) de los sólidos pulverulentos de ***Parthenium hysterophorus*** **Linn.,** bajo la influencia de diferentes humedades relativas.

Humedad relativa %	Concentración t_0 %	Concentración %
47,2	0.1	$7.524.10^{-4}$
70.4	0.1	$6.977.10^{-4}$
97.5	0.1	$3.639.10^{-4}$

En los anexos 1, 2 y 3 se muestran los cromatogramas correspondientes a cada ambiente de humedad.

Influencia de la luz.

a) Características organolépticas.

Durante el tiempo de estudio transcurridos (30 días), no se observó cambios en el color, olor y aspecto de los sólidos pulverulentos, en ninguna de las condiciones de almacenamiento estudiadas.

b) Análisis Químico.

Los resultados del análisis químico realizado en este estudio se muestran a continuación.

TABLA 3. Valores medios de la concentración de partenina (%) de los sólidos pulverulentos de ***Parthenium hysterophorus*** **Linn.,** bajo la influencia de la luz.

Condiciones de envase	Concentración t_0 %	Concentración %
Frasco incoloro	0.1	$7.295.10^{-4}$
Frasco ámbar	0.1	$8.117.10^{-4}$

Como se puede apreciar la luz provoca una reducción significativa del contenido de partenina en comparación con el material vegetal de partida.

En los anexos 4 y 5 se muestran los cromatogramas correspondientes a cada condición de envase.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios de influencia de la humedad y la luz en la estabilidad de los sólidos pulverulentos, se debe utilizar un envase que proteja de ambos factores a los mismos, así como a las formulaciones que los contenga.

III.2. Formulación y elaboración de los granulados.

En este trabajo se elaboraron granulados a partir de los sólidos pulverulentos del ***Parthenium hysterophorus, L,*** ya que en trabajos precedentes (57), se demostró que estos sólidos presentan propiedades químico-físicas y tecnológicas, que limitan su inclusión en una forma de dosificación sólida. Se escogieron como aglutinantes el Eudragit L y el acetoftalato de celulosa, estas sustancias tienen como característica común, el ser gastrorresistentes, por tanto deben dar como resultado un granulado entérico, de forma que la liberación del principio activo ocurra a nivel intestinal, aspecto deseado teniendo en cuenta la acción como antiparasitario a este nivel que se le reporta a esta planta. Considerando que no resultó posible la aglutinación efectiva del extracto seco solamente, se decidió hacer mezclas de este con excipientes de uso común en formas de dosificación sólidas, como la lactosa y el almidón; al seleccionar las concentraciones del sólido pulverulento empleada en cada variante de formulación, se tuvo en cuenta, que los extractos de plantas medicinales normalmente se usan en concentraciones altas, para lograr la acción terapéutica (64). La concentración de los aglutinantes en solución, se seleccionó atendiendo a lo reportado en la bibliografía y además sobre la base de experiencias prácticas. Los excipientes usados, se emplearon a las concentraciones reportadas (52)

III.3. Caracterización tecnológica de los granulados obtenidos a partir del *Parthenium hysterophorus, L.*

(a) Análisis granulométrico

Los resultados obtenidos en relación a el análisis granulométrico, de las variantes de granulados en estudio se muestran en los siguientes gráficos.

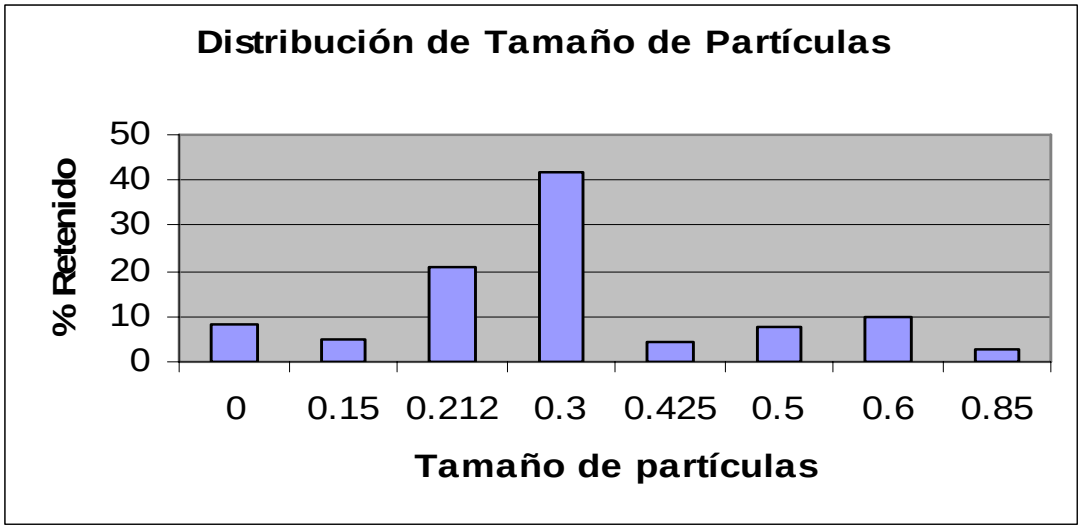


Gráfico 1: Distribución de tamaño de partículas del granulado con el extracto seco al 30% y el Eudragit L como agente aglutinante.

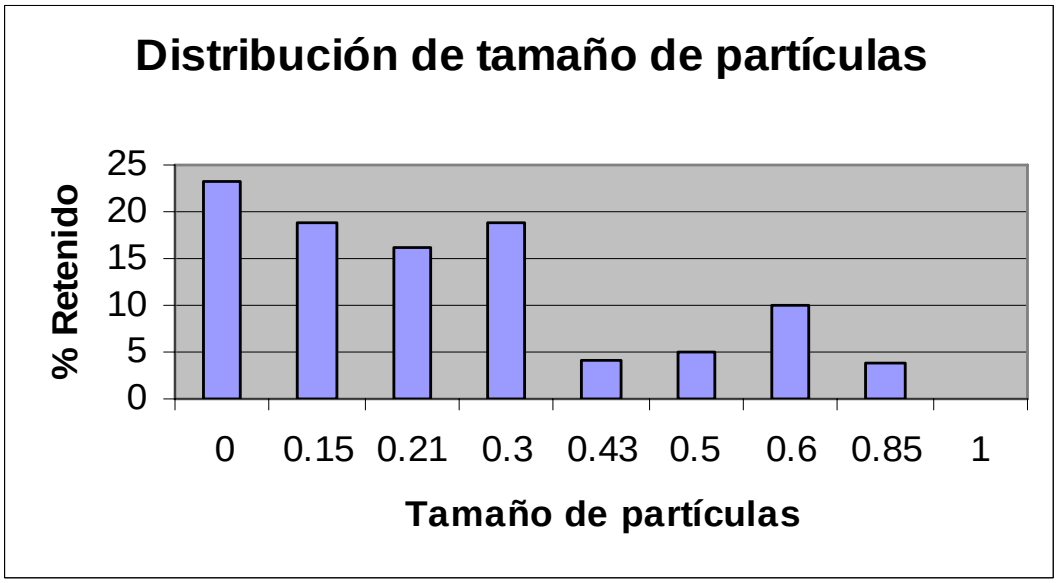


Gráfico 2: Distribución de tamaño de partículas del granulado con el extracto seco al 40% y el Eudragit L como agente aglutinante.

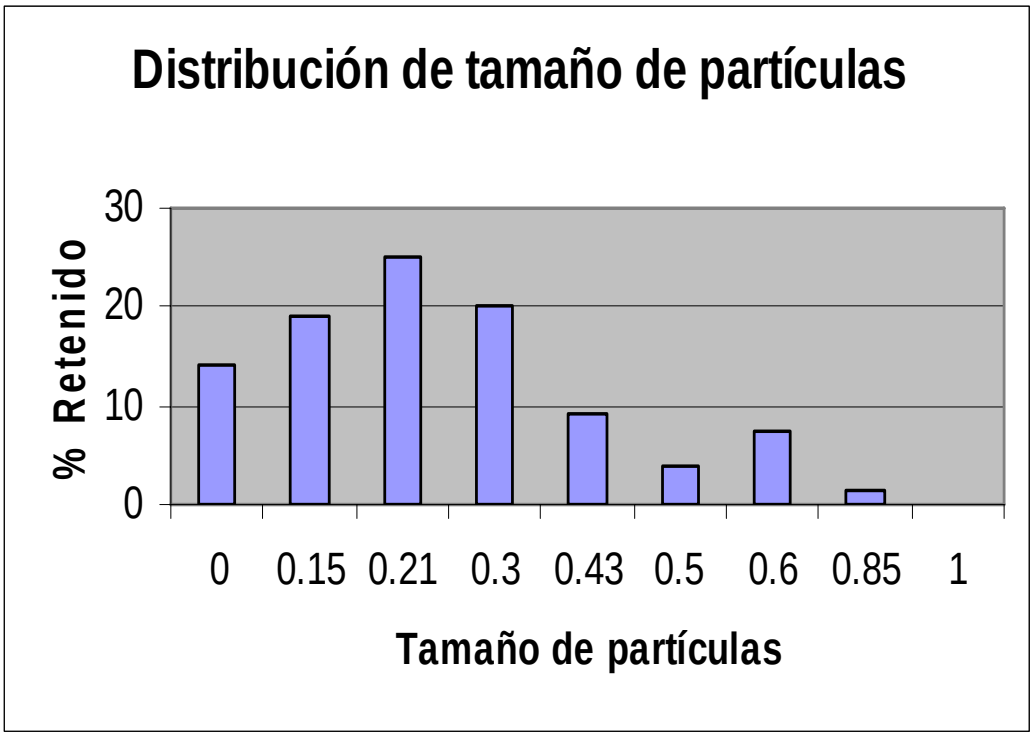


Gráfico 3: Distribución de tamaño de partículas del granulado con el extracto seco al 50% y el Eudragit L como agente aglutinante.

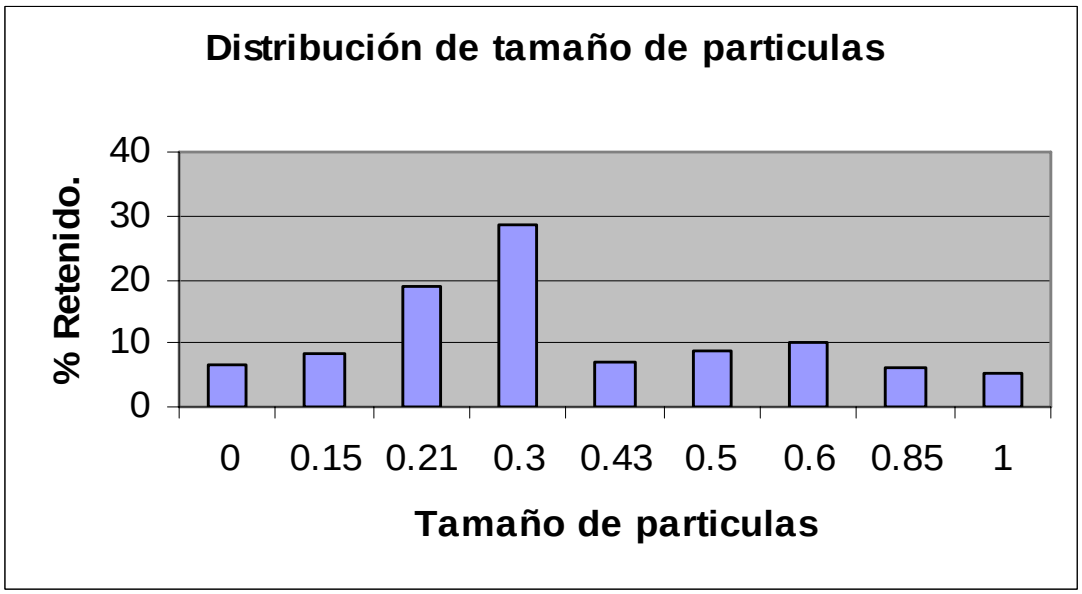


Gráfico 4: Distribución de tamaño de partículas del granulado con el extracto seco al 30% y el acetoftalato de celulosa como agente aglutinante.

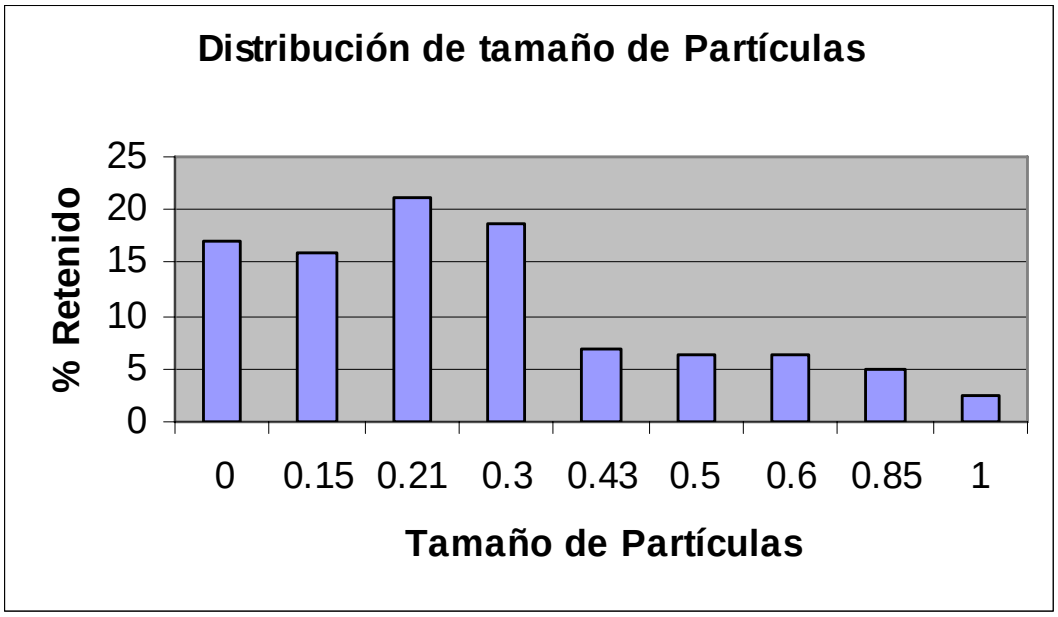


Gráfico 5: Distribución de tamaño de partículas del granulado con el extracto seco al 40% y el acetoftalato de celulosa como agente aglutinante.

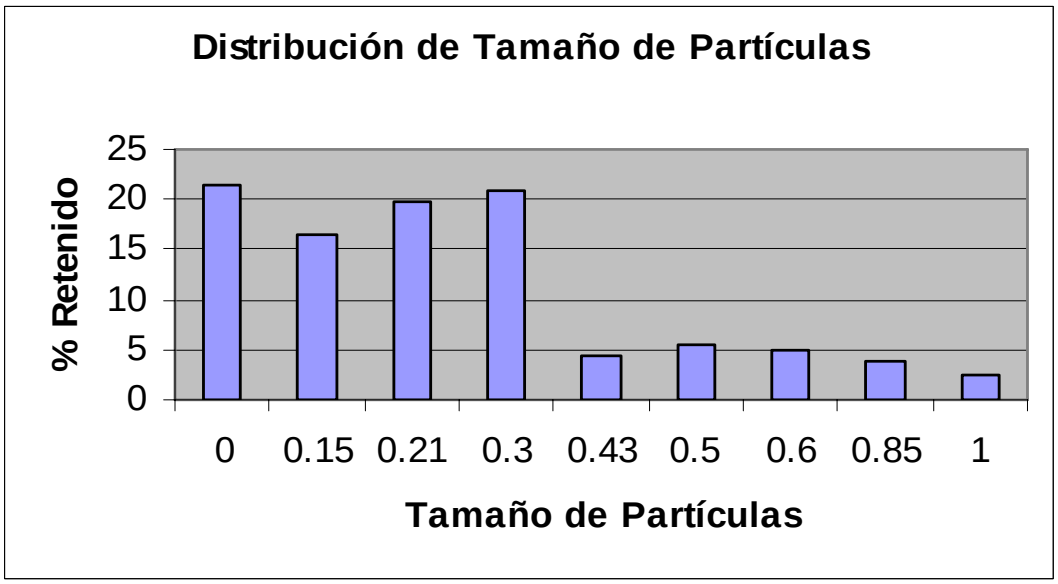


Gráfico 6: Distribución de tamaño de partículas del granulado con el extracto seco al 50% y el acetoftalato de celulosa como agente aglutinante.

Como se puede observar en los gráficos anteriores, los mejores resultados se obtienen en los casos en que se empleó el extracto seco al 30 %, con ambos tipos de aglutinantes,(con destaque para la variante donde se emplea el Eudragit L como aglutinante) ya que se observa en los mismos, que la masa de gránulos tiene una distribución normal de tamaño de partículas, con una moda alrededor de los 0,3 mm, mientras que el porciento de finos, está por debajo del 15%, todos estos aspectos coinciden, con lo reportado en la literatura para un granulado ideal en relación al tamaño de partículas.(52). Esto es lógico de esperar, ya que en estas variantes de granulados, se utilizó la menor concentración de extracto seco, el cual por experiencias practicas, se comprobó que es muy difícil lograr su aglutinación solo, por otro lado los excipientes empleados son de uso común en formas sólidas de dosificación, con adecuada capacidad para aglutinarse. En las demás variantes ensayadas, como se puede observar en los gráficos, la mayor dificultad estriba, en el alto % de polvo fino obtenido, que puede afectar las propiedades reológicas del granulado, así como traer consigo problemas de dosificación en la forma farmacéutica por estratificación de las partículas de menor tamaño.

(b,c,d) Densidad aparente, real y porosidad.

Los valores medios de la densidad aparente, real y porosidad de los granulados estudiados se muestran a continuación:

TABLA 4. Valores medios de densidad aparente, real y porosidad de los granulados elaborados con Eudragit L y acetoftalato de celulosa como aglutinante.

Granulados	Densidad aparente (g/cm^3)	Densidad Real (g/cm^3)	Porosidad (%)
Ext. 30% Eudragit L	0.348	0.647	46.21
Ext. 40% Eudragit L	0.399	0.619	35.54
Ext. 50% Eudragit L	0.336	0.508	33.85
Ext. 30% Acetoftalato de celulosa	0.396	1.11	64.325
Ext. 40% Acetoftalato de celulosa	0.357	1	64.3
Ext. 50% Acetoftalato de celulosa	0.342	0.85	58.8

Leyenda: Ext. Extracto seco.

Los resultados obtenidos en todos los casos los consideramos adecuados, pues se acercan en gran medida a los valores ideales reportados en la literatura,(52) máxime si se tiene en cuenta que estos granulados, se pretenden comercializar de esta forma, mezclándolos con el pienso de los animales y no llevar a comprimidos. Se puede destacar en este caso el granulado que emplea el extracto seco al 30% y el acetoftalato de celulosa como agente aglutinante, como el de mejores resultados.

(e,f) Ángulo de reposo y Velocidad de flujo.

Los valores medios de ángulo de reposo y velocidad de flujo de los granulados estudiados se muestran a continuación:

TABLA 5. Valores medios de Ángulo de reposo y Velocidad de flujo de los granulados elaborados con Eudragit L y acetoftalato de celulosa como aglutinante.

Granulados	Ángulo de reposo (°)	Velocidad de flujo (g/cm^2s)
Ext. 30% Eudragit L	24.058	10.025.
Ext. 40% Eudragit L	24.352	9.4
Ext. 50% Eudragit L	25.55	8.307
Ext. 30% Acetoftalato de celulosa	25.864	8.846
Ext. 40% Acetoftalato de celulosa	35.067	6.91
Ext. 50% Acetoftalato de celulosa	39.64	6.329

Leyenda: Ext. Extracto seco.

En la tabla anterior se puede observar que los mejores resultados en este sentido se obtienen en las variantes de granulados donde se emplea el Eudragit L como aglutinante y cuando se utiliza el extracto seco al 30% y el acetoftalato de celulosa como aglutinante, ya que en todos estos casos se cumple con lo establecido por la literatura (52) para estos parámetros, donde se plantea que un granulado óptimo debe presentar una velocidad de flujo mayor o igual a 7 $g/cm^2.s$ y un ángulo de reposo menor de 30^o. El resto de los granulados estudiados como se

puede apreciar no cumple con estas especificaciones. Se de be destacar como mejor granulado en este estudio el que presenta el extracto seco al 30% y el Eudragit L como aglutinante, ya que presenta la mayor velocidad de flujo y el menor ángulo de reposo, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que es el granulado de mejor distribución de tamaño de partícula y menor humedad residual.

(g) Humedad Residual.

En la siguiente Tabla se observan los resultados de humedad residual de los diferentes granulados elaborados.

TABLA 6. Resultados medios de humedad residual de los granulados elaborados con Eudragit L y acetoftalato de celulosa como aglutinante.

Granulados	Humedad Residual (%)
Ext. 30% Eudragit L	5.1
Ext. 40% Eudragit L	5.7
Ext. 50% Eudragit L	6.2
Ext. 30% Acetoftalato de celulosa	5.3
Ext. 40% Acetoftalato de celulosa	6.1
Ext. 50% Acetoftalato de celulosa	6.5

Leyenda: Ext. Extracto seco.

En la Tabla mostrada se aprecia que la humedad residual para los seis granulados elaborados, se encuentra dentro de los límites establecidos para los materiales vegetales (5-10 %) (65). Estos resultados coinciden con lo reportado por León (57), al evaluar la

humedad residual de granulados de ***Parthenium hysterophorus,*** Linn., utilizando como aglutinante la carboximetilcelulosa y la gelatina.

De forma general la literatura (52), considera teóricamente que un granulado en buenas condiciones debe tener una humedad residual mayor del cero porciento, pero menor del 2%, aunque en la práctica hay granulados con una humedad residual mayor al 2% que fluye bien, esto último coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio. En este caso la menor humedad residual la presenta el granulado que emplea el extracto seco al 30% y el Eudragit L como aglutinante, coincidiendo con el granulado que mejor fluidez presenta, lo cual fue analizado anteriormente.

IV. CONCLUSIONES.

1. La humedad y la luz constituyen factores que influyen de manera significativa en la estabilidad química de los sólidos pulverulentos de ***Parthenium hysterophorus*** **Linn.**

2. Se obtuvieron granulados de forma adecuada, empleando las formulaciones propuestas, utilizando la granulación húmeda, método tradicional, como técnica de elaboración.

3. El granulado elaborado con el extracto seco al 30% y el Eudragit L al 20% en acetona-isopropanol (1:1) como aglutinante, presenta las mejoras características tecnológicas.

V. RECOMENDACIONES.

1. Estudiar la influencia de la temperatura en la estabilidad de los sólidos pulverulentos de Parthenium hysterophorus Linn.
2. Desarrollar y validar una técnica analítica para la cuantificación de la partenina en el granulado, con vistas a los estudios de estabilidad del mismo.

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. Revista Bohemia. " Medicina verde regalo de la naturaleza " 38: 4 – 6; 1990.
2. Hermano Alain. Flora de Cuba (5): 191 – 92; 1964.
3. Roig Juan Tomás." Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos ". Tomo (1): 385; 1965 .
4. Roig Juan Tomás y Mesa. " Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba ": 354 – 56; 1974.
5. García Cañizares Felipe. Botánica General y descriptiva: 485; 1975.
6. Research Bulletin of the Panjab University 44 (1): 105 – 49; 1994 .
7. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Plantas medicinales. Fitomed (2). Editorial Ciencias Médicas: 117;.1993.
8. Rodríguez García S. " Plantas indeseables en el cultivo de la caña de azúcar ": 196; 1988 .
9. Colectivo de autores. Compendio de plantas medicinales: 205 – 26; 1978.
10. Fuentes V.R. Comparación de la utilización de las plantas medicinales en la medicina tradicional de varios países. Boletín de reseñas (17): 7 – 79; 1986.
11. Galbán Díaz Milena ; Ruiz Guitierrez Yitse. " Análisis farmacognóstico y fitoquímico de Parthenium hysterophorus L ". Trabajo de diploma. Universidad Central de las Villas. Departamento de Química Farmacia: 7 – 8; 1997.
12. Montanaro S; Bardón. A; Catalán C.A.N. " Antibacterial activity of various sesquiterpone lactones 2. En: Revista Fitoterapia 2: 185 – 86; 1996 .
13. Sharma G. L; Bhutani K.K. " Plant based antiamoebic drugs part (2). Amoebicidal activity of Parthenium isolated from Parthenium hysterophorus ". Planta Médica. January 30; 1987.
14. Bandolin A.L; Mendiondo M.E; Rondina K.V: " Survey of Argentine Medicinal Plants (1) ". Folklore and phytochemical screening Lloydia 35 (1): 69 – 80; 1972.
15. Gisberty G.C." Herbal folk medicine in northwestern Argentine Compositae ". En: J. E. Ethnopharmacol (Argentina) 7 (13): 321 – 41; 1983.

16. Towers G. H; Mitchell J. C. ” The current status of the weed Parthenium hysterophorus L as a cause of allergic contact dermatitis “. En : Contact Dermatitis 9 (6): 465 – 69; 1983.

17. Loustalot A.J; Pagan C. “Local Fever plants tested for presence of alkaloids “. En: El Crisol (Puerto Rico) 3 (5): 3; 1994.

18. Haque K.E; Roy L.P; Dutta C.P; “ Phytochemical investigation of Parthenium hysterophorus L: An irritating but promising weed “. En: J.Indian Chemsol (India) 61 (1): 92; 1984.

19. Kumar S; Grevat R.S.” Parthenium dermatitis; an unsuspected allergy “. En : Indian..J . Med.Sci 47 (12): 280 – 82; 1993.

20. Mohammad Ali Kahn ; Ahmad Ziauddin . “ Ethnobotanical studies of certain rare medicinal plants of Bhopal (India) “ . En : Revista Fitoterapia 6 : 517 ; 1993 .

21. Bhullar M.K; Kalsi P.S; Chhabra B.R: “ Methoxypseudoguaianolides from Parthenium hysterophorus “. En: Revista Fitoterapia (1): 91; 1997.

22. House et al. ″ Plantas medicinales comunes de Honduras. Parthenium hysterophorus″ : 319; 1995.

23. Robineau L. “ Hacia una farmacopea caribeña.Investigación cietífica y uso popular de las plantas medicinales en el Caribe “. Seminario tramil 5 y 6 (ed); 1990 – 92.

24. Rodríguez E.” Ecogeographic distribution of secondary constituens in Parthenium (Compositae) “. En: Biochem Syst Ecol (USA) 5: 207; 1977.

25. Gupta R. K; Dutta T.R; Patil B.D. “ Chemical investigation of Parthenium hysterophorus “. En : Indian. J. Pharmacy (India) 39: 64 – 66; 1977.

26. Badami R.C; Aptil K.B; Shivamurthy S. C.En: “ Chemical examination of Parthenium seed oil J. oil Technol ass India “ 8:5; 1976.

27. Mane J. D; Jadhav S. J; Ramaiah N. A. “ Production of oxalic acid from dry powder of Parthenium hysterophourus L “. En: J. AGR Food Chemm (India) 34 (6): 989 – 90; 1986.

28. Cuéllar Cuéllar Armando .” Química de los fármacos naturales: breves apuntes teóricos y prácticos “. Universidad de la Habana. Facultad de Biología: 67, 454, 554; 1983.

29. Jaroslav Picman; Anna Picman. “ Treatment of dermatitis from parthenin “. En: Contact Dermatitis 13: 9 – 13; 1985.

30. Talakal T. S; Dwivedi S. K; Sharma S. R. ” In vitro and in vivo therapeutic activity of Parthenium hysterophorus against Trypanosoma evansi “. En: Indian J. Exp. Biol 33 (11): 894 – 96; 1995.

31. Mukherjee B; Chatterjee M.“ Antitumor activity of Parthenium hysterophorus and its effect in the modulation of biotransforming enzimes in transplanted murine leukemia “. En: Planta Médica 59 (6): 513 – 16; 1993.

32. Geda A; Bokadia M. “ Antimicrobial activity of essential oils in human pathogenic bacteria “. En: SCC – CULT (Indian) 46 (1): 33 – 35; 1980.

33. González García Olga. “ Identificación y caracterización de la partenina, principal Hausen B.M.” Parthenium hysterophorus allergy. A weed problem in Indian “. En: Derm – Beruf – Umqelt 26 (4): 115 – 20; 1978.

34. lactona del Parthenium hysterophorus L “; 1996.

35. – Carvajal Daisy; Casaco A; Arruzazabala Lourdes; González.R; Sierra Patricia; Fajardo. M; et al. “Evaluación farmacológica de extractos de plantas con reportes en la medicina popular como cardiotónicos, hipotensores y antiasmáticos “. En: Revista de platas medicinales (3): 15; 1983.

36. Sharma S. K; Sing V. P.” The antifungal activity of some essential oils “. En: Indian Drugs Pharm Ind 4 (1): 3 – 6; 1979.

37. Kamal.K; Nathur. N.” Larvicidal and amoebicidal activities of pyrethrins extracted from plnt sources other than pyrethrum, crysanthemum cinerariaefolium vis “. En: Pyrethrum Post 19 (2): 54 – 60; 1994.

38. Ananth. M; Narasimhan T.R; Swamy M. N. “ Toxicity of Parthenium hysterophorus to cattle and buffaloe”. .En: Experentia 33 (10): 358 – 59; 1977.

39. Burry J.N; Kloot P. M. “The spread of composite weeds in Australia “. En: Contact Dermatitis 8 (6): 480 – 83; 1980.

40. Lonkar A; Nagasampagi B. A. “ An antigen from Parthenium hysterophorus “. En: Contact Dermatitis 2 (3): 150 – 54; 1976.

41. –Lonkar A; Nitchell J. C; Calnan C. D.” Contact dermatitis from Parthenium hysterophorus “.En: Tran – St – Johns – Hosp – Dermatol.Soc 60 (1): 45 – 53; 1974.

42. Cechini Tina. Enciclopedia de las hierbas y de las plantas medicinales: 487 – 88; 1980 .

43. Siddiqui M. A; Singh. R; Sharma R. C.” Contact Dermatitis due to Parthenium hysterophorus “. En : Indian. J. Med. Res 68: 481 – 84; 1978.

44. Dhillon Ranjit; Kaushal Nayyar . " Chemical transformations of alfa metileno gamma lactones of Parthenium hysterophorus L and Inula Racemosa Hock and ovicidal activity of productos against maize borer , C. partellus ". En : Indian Journal of Chemestry vol 33(B): 1038 – 42; 1994.

45. Rao M; Prakash O; Subba Rao P. V. " Reagenic allergy to Parthenium pollen; evaluation by skin test and RAST ". En: Clin Allergy 15 (5): 449 – 54; 1985 .

46. Seetharamiah A. M; Viswanath B; Rao P. V. " Atmospheric survey of pollen of Parthenium hysterophorus. Ann allergy " 47 (3): 192 – 96; 1981.

47. Sriramarao P; Nagpal. S; Rao D. S. " Inmediate hipersensivity to Parthenium hysterophorus . Clinical studies in the prevalence of Parthenium rhinitis ". En: Clin – Exp – Allergy " 1 (1): 55 – 62; 1991.

48. Gupta N; Martin B. M; Metcalfe D. D; Rao P. V. "Identification of a novel hydroxyprrpline – rich glicoprotein as the major allergen in Parthenium polen ". En : J. Allergy Clin Immhol 98 (5) tomo 1: 903 – 12; 1996.

49. Leporatti M.L; Guarrera P. M; M de Giacomo." Wild and ornamental toxic plants in Latium region (Central Italy) ". En: Revista Fitoterapia 6: 517; 1996.

50. Tanner M. S; Mattocks A. R. " Hypothesis : plant and fungal biocides copper and Indian childhood liver disease ". En : Ann – Trop – Paediatr 7 (4): 264 – 69; 1987.

51. Narasimhan T. R; Harindranath; Kurup C. K; Rao P. V. " Effect of parthenin on mitocondrial oxidative phosphorylation ". En: Biochmen Int 11 (2): 239 – 44; 1985.

52. Iraizoz Colarte Antonio; Bilbao Revoredo Ofelia; Barrios Alvarez Aurora. Universidad de la Habana. Facultad de Farmacia y alimentos: 98 – 125, 170 –73, 190 –91, 200 – 205, 211 –12; 1990.

53. Suñé Negre J. M " Granulación". En: Faulí Trillo C; Aroztegui Trenchs Monserrat; Azemar Sazatornil Nuria; Barbe Rocabert Coloma; Bel Prieto Elvira; Bustamante Martínez Pilar; et a; 1993.

54. Lachman León." The theory and practice of industrial pharmacy″: 320 – 21, 327 – 28; 1986 .

55. King E.Robert y Joseph B. Schwartz. " Oral solid dosage forms ". En: Remington ′s pharmaceutical sciences part 7 y 8: 1605 – 06, 1610, 1625 – 26; 1991.

56. Díaz Pérez Liliam María. " Caracterización de sólidos pulverulentos. Métodos para evaluar propiedades de flujo "; 1995.

57. León Iliana. Evaluación tecnológica del parthenium hysterophorus Linn. Trabajo de diploma. Facultad Química-Farmacia. UCLV. 1999.

58. Sellés Flores E. " Estabilidad de los medicamentos ". En: Faulí Trillo C; Aroztegui Trenchs Montserrat; Azemar Sazatornil Nuria; Barbe Rocabert Coloma; Bel Prieto Elvira; Bustamante Martínez Pilar; et al. " Tratado de farmacia galénica " primera edición: 59 – 61, 70 – 73; 1993.
59. Skoog, Douglas A. y Leary, James J.: Análisis instrumental. Cuarta edición, P. (674-775), Universidad de Barcelona, 1997.
60. Pradeau,: Análisis Químico Farmacéutico de Medicamentos. P. (405), 1998.
61. USP XXIII, 1995, Farmacopeas: Británica, 1998; Española, 1995.

62. Saucedo Hernández Yanelis. Tesis de yanelis. Tesis de Maestria. Universidad de la Habana. 1999.

63. Acosta Peraza Irene, García Soto del Valle Norelys M. Evaluación fitoanalítica y biológica de los extractos de las hojas del Phartenium hysterophorus Linn. Trabajo de Diploma. Facultad de Química-Farmacia. UCLV.1999.

64. Díaz Pérez Lilian M. Diseño y evaluación de comprimidos convencionales de extractos secos (Plantago Lanceolata). Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia Universidad de Santiago de Compostela. 1995.