

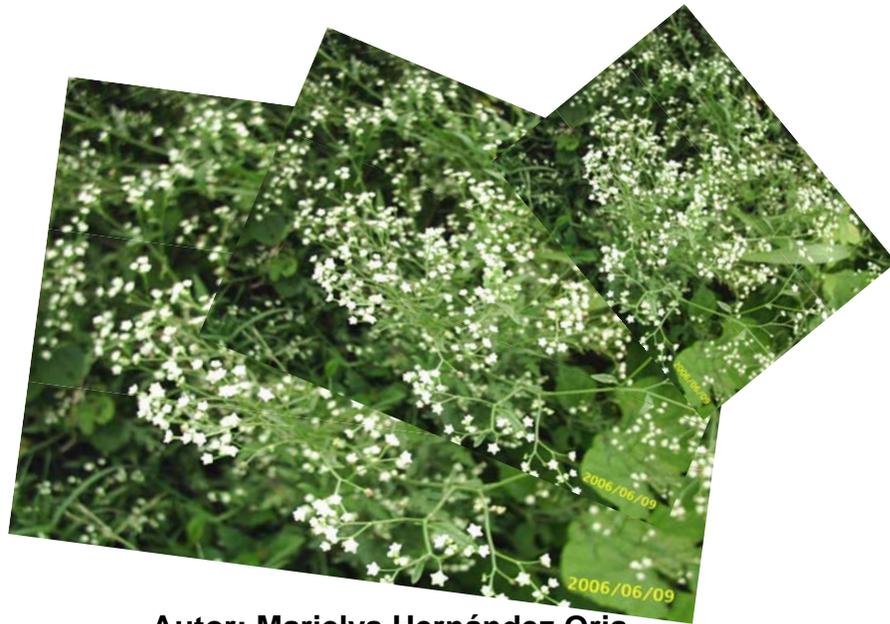


UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

Facultad de Química-Farmacia
Departamento de Licenciatura en Farmacia

**Evaluación Analítica de los sólidos
polverulentos del *Parthenium hysterophorus*, Linn.
Estudios de preformulación y formulación.**

**Tesis para optar por el grado de Licenciado
en Ciencias Farmacéuticas**



Autor: Marielys Hernández Oria.

**Tutores: MSc. Yanelis Saucedo Hernández.
MSc. Elisa Jorge Rodríguez.
MSc. Miguel Angel Alba de Armas.**

Asesor: Dr. Luis Bravo Sánchez.

Santa Clara
2006

RESUMEN.

La investigación desarrollada en el presente trabajo persiguió la evaluación analítica y tecnológica de los sólidos pulverulentos obtenidos a partir del *Parthenium hysterophorus*, Linn (escoba amarga), con vistas a la obtención de una forma de dosificación sólida oral, de uso antiparasitario. Como resultado novedoso de la investigación, se evalúa la influencia en la degradación del polvo de factores tales como: humedad, luz y temperatura, desarrollando su evaluación física y química, empleando como técnica analítica la Cromatografía Líquida de alta eficacia (CLAE) 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 Acetofalato de celulosa 15% en etanol-acetona (3:1). 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 sólido pulverulento al 30% resultó ser el que mejores ventajas ofrece para ser utilizado como una forma farmacéutica sólida de dosificación oral. 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*, Linn, CLAE, granulados, Acetofalato de celulosa.



INDICE

	Páginas
INTRODUCCION.	1
Objetivos generales	2
Objetivos específicos	
I-REVICION BIBLIOGRAFICA.	3
1.1 Aspectos generales de la planta.	3
1.1.1 Nombres vernáculos.	
1.1.2 Familia a la que pertenece.	3
1.1.3 Origen y distribución geográfica.	3
1.1.4 Descripción botánica.	3
1.1.5 Partes de la planta empleadas.	3
1.1.6 Usos en la medicina tradicional.	3
1.1.7 Composición química de la planta. Consideraciones estructurales y químicas de su principal ingrediente activo la partenina.	4
1.2 Aspectos tecnológicos.	5
1.2.1 Preformulación.	5
1.2.1.1 Aspectos que hay que tener presente en la etapa de preformulación.	6
1.2.2 Pruebas fisicoquímicas que se sugieren durante la preformulación.	11
1.2.2.1 Higroscopicidad.	11
1.2.2.2 Dinámica de la absorción de vapor.	12
1.2.2.3 Estabilidad en fase sólida	13
1.2.2.4 Factores que afectan la estabilidad de los sólidos pulverulentos.	14
1.2.3 Granulados.	16
1.2.3.1 Generalidades.	16
1.2.3.2 Evaluación de las propiedades tecnológicas de los granulados.	17
1.2.3.3 Métodos para evaluar las propiedades de flujo.	17

1.2.3.4 Formulación y evaluación de granulados del <i>Parthenium Hysterophorus</i> , Linn.	18
1.3 Consideraciones de la estabilidad en los medicamentos.	18
1.3.1 Definición de estabilidad.	
1.3.2 Factores que inciden en la estabilidad de un medicamento.	18
1.4 Técnica de extracción en productos naturales.	19
1.4.1 Extracción por ultrasonido (Sonificación).	19
1.5 Consideraciones analíticas.	20
1.5.1 Cromatografía líquida de alta precisión (CLAE).	20
1.5.2 Técnicas analíticas para las Lactonas sesquiterpénicas.	21
1.5.3 Aplicación de la cromatografía líquida de alta eficacia para el análisis y aislamiento de las Lactonas sesquiterpénicas.	22
1.5.4 Aplicaciones del CLAE.	22
1.5.5 Comprobación de linealidad en técnicas de análisis cuantitativo.	23
II. MATERIALES Y METODOS.	27
2.1 Caracterización tecnológica del sólido pulverulento de <i>Parthenium hysterophorus</i> , Lin.	27
2.1.1 Análisis granulométrico.	27
2.1.2 Densidad aparente.	27
2.1.3 Densidad real.	28
2.1.4 Porosidad.	29
2.1.5 Angulo de reposo.	30
2.1.6 Velocidad de flujo.	31
2.1.7 Humedad residual (Pérdida por desecación).	31
2.2 Determinación del intervalo lineal de la técnica de Cromatografía Líquida de alta eficacia aplicable en la determinación de partenina en los sólidos pulverulentos de la planta.	32
2.3 Estudio de los factores que pueden influir en la estabilidad de los sólidos pulverulentos de <i>Parthenium hysterophorus</i> , Linn.	35

2.3.1 Influencia de la Humedad.	36
2.3.2 Influencia de la Luz.	37
2.4 Pruebas fisicoquímicas desarrolladas en la etapa de preformulación.	37
2.4.1 Higroscopicidad.	37
2.4.2 Dinámica de la adsorción de vapor.	38
2.4.3 Estabilidad en fase sólida.	38
2.5 Formulación y elaboración de los granulados.	39
2.6 Caracterización tecnológica de los granulados obtenidos a partir del <i>Parthenium hysterophorus</i> Linn.	40
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	41
3.1 Caracterización tecnológica del sólido pulverulento de <i>Parthenium hysterophorus</i> , Linn.	41
3.2 Determinación del intervalo de linealidad aplicable en la cuantificación de partenina, ingrediente activo principal a partir de los sólidos pulverulentos de <i>Parthenium hysterophorus</i> , Linn.	43
3.3 Estudio de los factores que pueden influir en la estabilidad de los sólidos pulverulentos de <i>Parthenium hysterophorus</i> , Linn.	45
3.3.1 Influencia de la Humedad.	45
3.3.2 Influencia de la Luz.	47
3.4 Pruebas fisicoquímicas desarrolladas en la etapa de preformulación.	48
3.4.1 Higroscopicidad.	48
3.4.2 Dinámica de la adsorción de vapor.	49
2.3.3 Estabilidad en fase sólida.	49
3.5 Formulación y elaboración de los granulados.	51
3.6 Caracterización tecnológica de los granulados obtenidos a partir del <i>Parthenium hysterophorus</i> , Linn.	52

IV. CONCLUSIONES.	58
V. RECOMENDACIONES.	59
VI. BIBLIOGRAFIA.	60
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, el estudio y utilización de las plantas medicinales han tomado un notable auge. Desde tiempos inmemorables, ellas constituyeron el principal arsenal terapéutico del hombre. A mediados del siglo XIX, debido al desarrollo alcanzado por la síntesis de productos orgánicos, estas comienzan a ser relegadas a un segundo plano, pero siempre han representado una parte considerable en las fuentes de materia prima para la fabricación de medicamentos.

Hoy tras la evolución de la industria farmacéutica la medicina herbolaria conoce un nuevo florecimiento, como si volviera a sus raíces, especialmente en los países en desarrollo donde no solo se rescata un rico acervo cultural, sino que constituye una valiosa fuente donde obtener una gran cantidad de principios activos, los cuales pueden ser utilizados de forma natural o semisintética, constituyendo una alternativa de solución para numerosos problemas que enfrenta el campo de la salud pública en el tratamiento de las enfermedades.

El *Parthenium hysterophorus*, Linn conocida comúnmente como escoba amarga es usada ampliamente por la población como antipirético, antiparasitario y en el tratamiento de afecciones de la piel. Una vez lograda su estandarización como droga, se requiere la realización de estudios tecnológicos y analíticos que permitan, el diseño y evaluación de una forma farmacéutica oral que contenga el sólido pulverulento de la planta, garantizando los requisitos de calidad, seguridad y eficacia.

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

Objetivos generales:

- ✓ 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:

- ✓ Obtener y caracterizar tecnológicamente los sólidos pulverulentos obtenidos a partir de la planta.
- ✓ Estudiar la influencia de la luz, humedad y temperatura en la estabilidad física y química de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn.
- ✓ Evaluar la higroscopicidad de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, Linn.
- ✓ Evaluar el comportamiento de la dinámica de adsorción desorción del polvo obtenido a partir de la planta.
- ✓ Elaborar y caracterizar tecnológicamente un granulado obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn utilizando el sólido pulverulento al 30 %, 40%, 50% y como aglutinante una solución de acetofalato de celulosa al 15% en etanol-acetona (3:1).

I. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1.1 Aspectos generales de la planta.

1.1.1 Nombres vernáculos: Artemisilla, confitillo (Cuba); ajeno cimarrón, artemisa, Santa María, yerba amarga (Puerto Rico); feverfew, mugwort (Estados Unidos y Antillas Inglesas); botonera (Venezuela) (2).

1.1.2 Familia a la que pertenece: Familia compuesta; tribu: tubulifloras (3).

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 (4).

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 (2).

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. (2, 5, 6 y 7).

1.1.4 Descripción botánica: Es una yerba anual estingosa-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 8).

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, 3 y 8) y en baños contra los granos (2).

En la ciénaga y península de Zapata se utiliza para inmunizarse contra el Paludismo y en Camagüey se emplea para enfermedades del pecho (2).

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 (2).

La decocción o el polvo de la planta aplicada en ungüentos da resultados positivos contra herpes, sarna y tiña (2 y 9).

Otras propiedades atribuidas son: corroborante vermífuga, antiparasitaria, contra las afecciones gastrointestinales, del hígado, de los nervios, y antiprurítica (6 y 10).

Además tiene la propiedad de ser antineurálgica (2, 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 (2).

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 de la planta. Consideraciones estructurales y químicas de su principal ingrediente activo la partenina.

- 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, kaempferol (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).

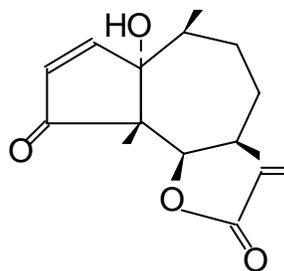
Se plantea que la partenina es el principio activo que está presente en el *Parthenium hysterophorus* Linn (5, 8, 12 y 24). Este componente es una lactona sesquiterpénica con esqueleto de pseudoguayano; y en este sentido se destacan tres tipos de lactonas: xantonólidas, partenólidas y ambrosanólidas, 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).

Formula molecular: $C_{15}H_{18}O_4$.

Peso molecular: 262.305.

Estructura química: (30).



1.2 Aspectos tecnológicos.

1.2.1 Preformulación.

Comprende la labor que abarca el conocimiento de las características básicas tanto biofarmacéuticas como fisicoquímicas que van a influir en la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento, se conoce como estudios de preformulación.

El desarrollo de una nueva formulación implica una selección de excipientes y la realización de un proceso tecnológico de complejidad variable. La caracterización

de estas propiedades constituye la etapa de preformulación farmacéutica necesaria para conseguir tres cualidades fundamentales del medicamento: estabilidad, seguridad y eficacia. La preformulación implica la realización de diferentes estudios destinados a conocer: pureza, solubilidad, capacidad de absorción, estabilidad, compatibilidad con excipientes, caracterización del perfil biofarmacéutico y farmacocinética de nuevos principios activos en diferentes especies animales

Una exigencia fundamental para iniciar los estudios de preformulación es la disponibilidad de técnicas analíticas que reúnan unas características adecuadas para la correcta determinación cualitativa y cuantitativa del fármaco en la realización de los diferentes estudios.

1.2.1.1 Aspectos que hay que tener presente en la etapa de preformulación.

a) Consideraciones previas en el desarrollo del medicamento.

Deben tenerse en consideración elementos farmacodinámicos tales como: Propiedades farmacodinámicas que incluye la finalidad terapéutica, efectos tóxicos, reacciones adversas, dosis, características farmacocinéticas y frecuencia de administración. Dentro de las características de los enfermos a los que se dirige: aceptación, comodidad del medicamento y costo del mismo.

Se deben tener presente los aspectos terapéuticos en el desarrollo de una formulación, la forma farmacéutica más adecuada para un medicamento, es necesario tener presente al enfermo al cual va destinado. Las características farmacocinéticas se deben tener en cuenta en el desarrollo de las nuevas formulaciones, ya que las peculiaridades de absorción y eliminación pueden influir en el tipo de formulación.

b) Consideraciones biofarmacéuticas.

Para conseguir el efecto terapéutico es necesario que el principio activo llegue a su lugar de acción. Esta respuesta depende de las características propias del fármaco (cualidades fisicoquímicas) y de las particularidades de la formulación (particularidades farmacotécnicas). Ambas están relacionadas e influyen en las propiedades biofarmacéuticas del medicamento: biodisponibilidad, características fisiológicas de la vía de administración, factores limitantes de la absorción, características fisicoquímicas empleadas en la solubilidad, factores de formulación

que influyen en la solubilidad, ensayos de velocidad de disolución “in vitro” y correlación in vitro \ in vivo.

e) Consideraciones fisicoquímicas.

Las características fisicoquímicas y farmacotécnicas evaluadas son: cristalinidad y polimorfismo, punto de fusión, solubilidad, fluidez, estabilidad y compatibilidad.

Se incluyen los estudios destinados a conocer en profundidad la sustancia activa, para obtener datos de interés galénico y conocer las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa pura y en mezcla con determinados disolventes, excipientes y materiales de acondicionamiento. Algunos de estos estudios se llevan a cabo en condiciones extremas de temperatura, luz, humedad y oxígeno para acelerar y así poder detectar posibles reacciones entre los componentes.

Descripción del estado físico

El primer paso en el conocimiento de una sustancia podría ser la descripción del estado físico. La mayoría de los fármacos utilizados en la actualidad son sólidos a las condiciones de temperatura y presión ambiental.

Microscopía

Esta técnica suministra información sobre la forma de las partículas; si son asilares, laminares, de aspecto rugoso, etc. Así mismo se puede determinar si son de aspecto cristalino o amorfo.

Tamaño de partículas

La disolución, la reactividad química y la fluidez de una sustancia, así como la homogeneidad de la formulación que la contiene, dependen del tamaño, forma y morfología de la superficie de las partículas que constituyen dicha sustancia activa. Por ello tiene gran interés en la fase de preformulación el análisis granulométrico, que proporciona información sobre el tamaño medio de las partículas, su homogeneidad y la forma de las mismas. Las técnicas de análisis granulométrico habitualmente utilizadas son la microscopía óptica y la tamización analítica.

Cristalinidad y polimorfismo

El hábito cristalino y la estructura interna de una sustancia activa pueden afectar a algunas de sus características tales como fluidez y estabilidad química. Hábito

cristalino es la descripción del aspecto externo de los cristales, mientras que la estructura interna es la disposición de los elementos dentro de los sólidos.

Punto de fusión

La determinación del punto de fusión de un principio activo puede medirse utilizando fundamentalmente tres técnicas: Método del capilar, Microscopia de platina caliente, Calorimetría diferencial de barrido (31).

El método del capilar consiste en la observación directa, o bajo lupa, de la muestra introducida en un capilar, el cual se encuentra en contacto con una pieza metálica con calentamiento programado. Así se obtiene información sobre el intervalo de fusión, pero resulta difícil determinar de forma exacta el punto de fusión. La calorimetría diferencial de barrido proporciona, no solo el punto de fusión exacto, sino también el calor de fusión.

Pureza

La mayoría de los fármacos contienen cantidades variables de impurezas inorgánicas como cloruros, sulfatos, fosfatos, metales pesados etc. los cuales proceden habitualmente de las materias primas, disolventes o utillaje empleado en los procesos de obtención. La determinación del agua, aunque no se considera una impureza resulta esencial para sus implicaciones en la evaluación de la potencia y la degradación de numerosos fármacos (32).

Solubilidad

Tanto si el posible fármaco se va a incluir en una forma sólida como en una líquida, la disolución es un proceso que siempre se llevaría a cabo, bien después de la administración (formas sólidas), inmediatamente antes de esta (formas de disolución extemporánea) o en la etapa de fabricación (formas líquidas). Los estudios de solubilidad en la etapa de preformulación incluyen: determinación del pKa, influencia de la temperatura, perfil de solubilidad en función del pH, coeficiente de reparto, mecanismo de solubilización, velocidad de disolución.

Propiedades de flujo

Las propiedades de flujo de una sustancia pulverulenta están afectadas por los cambios de tamaño de partícula, la densidad, la forma, las cargas electrostáticas y la humedad absorbida, factores que pueden producirse durante la etapa de

formulación o en el curso de fabricación. Para medir la fluidez se pueden utilizar mecanismos que permitan evaluar la velocidad de caída de la masa pulverulenta a través de orificios de diferentes diámetros. La densidad aparente, el ángulo de reposo, y la compresibilidad son características o parámetros íntimamente relacionados con la fluidez de una masa pulverulenta.

a) Densidad aparente

La densidad aparente de un sólido depende fundamentalmente del método de cristalización empleado en su purificación y del grado de pulverización. Cuando la densidad aparente de una sustancia no es adecuada, se puede modificar este parámetro por pulverización o mediante la incorporación a la formulación de sustancias con densidad bastante diferente a la de la sustancia activa.

b) Angulo de reposo

Cuando una masa de polvo se deja caer libremente, las partículas de sólido se agrupan formando un cono. El ángulo formado por la horizontal; y la generatriz del cono se denomina "ángulo de reposo" y su valor numérico es indicativo de la capacidad de fluir la masa pulverulenta. Así, se considera que las sustancias con un ángulo inferior a 30 °C fluyen libremente, mientras que las que tienen un ángulo superior a 45 °C son sustancias cohesivas en las que se tiene que mejorar la fluidez.

c) Compresibilidad

El termino "compresibilidad" se refiere a la capacidad de las sustancias pulverulentas para compactarse. Numéricamente es una relación de densidades aparentes de la masa sin apelmazar y apelmazada, según la expresión:

$$\text{Compresibilidad}(\%) = \frac{d_{aa} - d_a}{d_{aa}} \cdot 100$$

La compresibilidad de una masa pulverulenta esta en relación inversa a la fluidez (31).

Absorbabilidad

En todo caso, durante la etapa de preformulación deben caracterizarse aquellas propiedades que condicionan el proceso de absorción de los fármacos en disolución, así como transporte a través de membranas biológicas mediante ensayos in vitro (32).

Estabilidad

Los objetivos de un programa de estabilidad en la etapa de preformulación son:

- Establecer las principales causas de alteración o factores de inestabilidad del principio activo (efecto de la luz, temperatura, humedad, oxígeno y pH del medio).
- Determinar las vías de degradación y la cinética a las que cursan (orden cero, orden uno, etc.).
- Identificar o establecer la naturaleza de los posibles productos de
- Obtener información para el diseño de estudios sucesivos.

Estabilidad del principio activo al estado sólido

El objetivo primario o principal de esta investigación es la identificación de las condiciones de almacenamiento para que el principio activo sea estable al estado sólido.

Estudios de compatibilidad

Elaborar formas farmacéuticas con un principio activo conlleva, habitualmente, la utilización de distintas sustancias auxiliares que, al estar en contacto directo con el fármaco, pueden afectar a su estabilidad. Es, pues, necesario para la selección de los excipientes que intervendrán en la forma farmacéutica final, el conocimiento de estas posibles interacciones. Los estudios de compatibilidad encuadrados dentro de la preformulación farmacéutica consisten en la evaluación de la estabilidad del principio activo en presencia de aquellos excipientes que, previsiblemente, entraran a formar parte de la forma farmacéutica (31).

Incompatibilidad con excipientes

La adecuada formulación de una forma de dosificación depende, en gran parte, de una cuidadosa selección de los excipientes, cuyos principales objetivos son facilitar la administración del fármaco y protegerlo de su degradación, promoviendo una adecuada liberación y biodisponibilidad (32).

1.2.2 Pruebas fisicoquímicas que se sugieren durante la preformulación.

- Análisis elemental.
- Metodología HPLC.
- Espectroscopia RMN.
- Espectroscopia de masa.
- Fórmula estructural y empírica general.
- IR/UV Visible.
- Espectroscopia.
- Kart Fischer.
- pKa.
- Log P/Log D.
- Solubilidad inicial.
- Estabilidad de la solución inicial.
- Cristalinidad
- Higroscopicidad.
- Estabilidad en fase sólida (33).

1.2.2.1 Higroscopicidad.

Método descrito por Callaghan et. al. (1982) para evaluar la higroscopicidad.

A 25 °C por 24h a 80% de Humedad Relativa.

- Ligeramente higroscópico: 0.2 - 2%
- Higroscópico: 2 – 15%
- Muy higroscópico: Mayor o igual que 15%
- Delicuescente: absorbe suficiente agua para formar un líquido.

Si un compuesto es muy higroscópico, podría normalmente ser rechazado. Sin embargo la decisión para proceder con un compuesto que tenga más o menos agua sería analizando caso por caso. Por ejemplo, un compuesto con una humedad mayor de un 5% no siempre se acompaña de efectos severos, esto puede permanecer estable y fluir libremente a pesar de un alto nivel de humedad superficial. Además la conversión a un hidrato podría ser beneficiosa en algunas circunstancias.

1.2.2.2 Dinámica de la absorción de vapor.

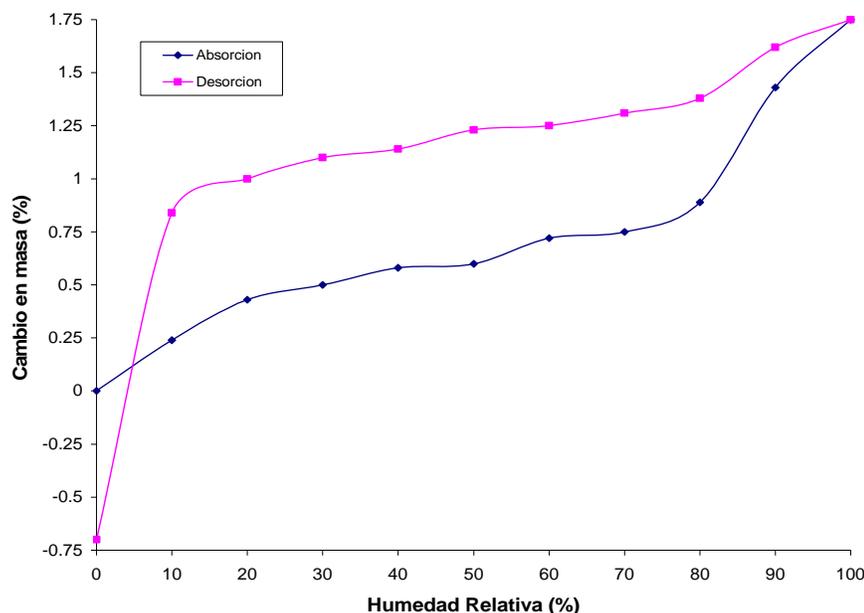
El estudio de las propiedades de higroscopicidad de un compuesto puede ser convenientemente desarrollado con pequeñas cantidades del compuesto utilizando un analizador de absorción de agua DVS-1.

El perfil de adsorción-desorción de agua de un compuesto es investigado. Esto puede revelar un rango del fenómeno asociado con el sólido. Por ejemplo una reducción de la humedad relativa desde un nivel alto, histéresis (separación de la curva adsorción – desorción) puede ser observado. Como es reportado por Umprayn y Méndez (1987) hay dos tipos de curva de histéresis. Lo primero es una apertura de la curva de histéresis donde el contenido de humedad final es más alto que el contenido de humedad al comienzo.

Por otra parte la curva de histéresis puede ser cerrada y se presume que sea debido a que los compuestos tengan un tamaño de poro capilar. El gráfico 3.12 muestra el comportamiento del estearato de magnesio exhibiendo el fenómeno adsorción-desorción de humedad.

La automatización de la medición de la absorción de humedad es relativamente de innovación reciente. (Marshall et al. 1994). Previo a este avance la adsorción de agua de compuestos fue determinada por exposición de pequeñas cantidades de un compuesto en desecadoras conteniendo soluciones de sales saturadas. Las soluciones saturadas de sales que dan humedades relativas definidas en función de la temperatura han sido reportadas por Nyqvist (1983). Las muestras son almacenadas a una temperatura seleccionada y analizadas a varios tiempos para la humedad y la estabilidad, usualmente por análisis termogravimétrico y CIAE, respectivamente.

Gráfico 3.12 Isotherma DVS del estearato de magnesio mostrando el comportamiento de la curva de adsorción - desorción de agua (33).



1.2.2.3 Estabilidad en fase sólida

En términos de estabilidad química de compuestos con respecto a la humedad fijada, las siguientes descripciones han sido usadas describir los tipos de humedad superficial.

Agua límite: el agua en exceso usada durante la reacción de degradación.

Agua adecuada: agua suficiente para descomponer al compuesto completamente.

Agua en exceso: es la cantidad igual o mayor que la cantidad de humedad para disolver las drogas.

Los materiales amorfos generalmente son menos estables que la fase cristalina correspondiente. En los sólidos amorfos, el efecto neto de adsorción de agua es disminuir la temperatura de transición del vidrio y de plastificar el material. A su vez esto aumenta la movilidad molecular y por consiguiente se incrementa la reactividad química.

En los sólidos amorfos el efecto de la adsorción de agua es más bajo que la temperatura de transición del vidrio. Este incremento de movilidad molecular se

correlaciona con un incremento en la reactividad química. A menudo las fases amorfas cristalizan con la exposición de la humedad (33).

1.2.2.4 Factores que afectan la estabilidad de los sólidos pulverulentos.

A.-Influencia de la Humedad.

La humedad es una de las causas más frecuentes de alteración de medicamentos, especialmente de formas sólidas. Es considerada como factor que favorece el desarrollo microbiano en muchas formas farmacéuticas e ingredientes activos, pero este no es más que uno de los múltiples efectos de la humedad sobre los medicamentos tanto en sus características físicas como químicas. Constituye uno de los problemas más importantes para la conservación de formas farmacéuticas sólidas, sobre todo cuando se combina con una temperatura elevada como ocurre en determinados países tropicales (34).

La humedad contenida en un medicamento puede tener dos orígenes:

- Residual: procede de las materias primas utilizadas o se ha incorporado en el proceso de fabricación. Su influencia sobre la estabilidad del medicamento se ha de evaluar en las etapas de preformulación y de formulación.
- Procedente del medio ambiente: la capta el medicamento durante su almacenamiento, al estar constituido por sustancias higroscópicas, o sencillamente, se encuentra en la atmósfera que rodea al medicamento dentro del envase primario. Su influencia sobre la estabilidad del medicamento es de importancia primordial a la hora de determinar las características del material de envasado primario, de establecer las condiciones de reposición y período de validez del mismo (34).

B- Influencia de la Luz.

La reacción fotoquímica es una fuente de degradación muy importante, no solo en el tiempo de almacenaje, sino también en el proceso de elaboración (35). En un gran número de sistemas que son fotolizados, como productos de reacciones subsecuentes, aparecen radicales libres. Si las moléculas que absorben la radiación toman parte por si mismas en la reacción principal, se dice que es una reacción fotoquímica. Cuando las moléculas que absorben no actúan por si mismas directamente en la reacción, pero pasan esa energía a otras moléculas para que lo hagan, se dice que la sustancia que absorbe es fotosensible (36).

Dentro de las reacciones más comunes en fotoquímica, tenemos la apertura de anillos pequeños, la pérdida de halógeno en compuestos polihalogenados, reordenamientos e isomerizaciones (35).

La influencia de luz afecta, principalmente, la estabilidad física y química del preparado, pues puede provocar cambio de color, variación de la viscosidad, reacciones térmicas y catálisis de otras reacciones (autooxidación, polimerización, etcétera); de ahí la importancia de la protección frente a las radiaciones electromagnéticas e incorporación de agentes fotoprotectores para lograr la estabilización de sustancias activas frente a reacciones fotolíticas (34).

C- Influencia de la temperatura.

La temperatura, es una de las causas más frecuentes de alteración de medicamentos, pues favorece muchas reacciones de descomposición de las sustancias activas e induce importantes alteraciones físicas de los medicamentos (34).

A temperaturas elevadas se modifican las características físicas de las formas farmacéuticas al producirse fenómenos de fusión, evaporación o pérdida de agua. La mayoría de las reacciones se aceleran a temperaturas elevadas. Se rompen cuando se enfrían hasta el punto de congelación de la fase acuosa, en disoluciones pueden aparecer cristales como consecuencia de la precipitación de alguno de los componentes (34).

Kopleman S.H. y. Augsburger L. realizaron un amplio estudio para determinar y comparar el perfil fitoquímico de tres extractos comerciales de *Hypericum Perforatum*; influencia de la humedad, temperatura, incidencia de la luz sobre la estabilidad y evaluación de propiedades físicas importantes para el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas de los extractos. Las propiedades físicas evaluadas fueron: tamaño de partículas, flujo, índice de compresibilidad, diámetro de mínimo orificio, higroscopicidad (Callaghan) y se recomienda el almacenamiento a bajas temperaturas (37).

1.2.3 Granulados.

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. (38).

1.2.3.1 Generalidades.

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 anhídrido 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. (32)

El método de granulación húmeda es muy usado porque produce gránulos de alta compresibilidad, aumenta considerablemente la 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 (32)

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. (38). 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 (32 y 39).

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 regranulación para darle tamaño al grano y romper cualquier aglomerado de gránulos que haya quedado después del secado (32 y 39).

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 (40).

1.2.3.2 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. (38)

1.2.3.3 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.(38)
- 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 (41)

c) Métodos basados en la determinación de la fuerza de cizalla.(41)

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 (41).

1.2.3.4 Formulación y evaluación de granulados del *Parthenium hysterophorus*, Linn.

León (42), 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 principales a las propiedades tecnológicas (análisis de distribución del tamaño de partícula, densidad aparente, densidad real, porosidad, ángulo de reposo y velocidad de flujo) las cuales resultaron ser deficientes y la humedad resultó ser un factor que afecta la estabilidad y la fluidez de los sólidos pulverulentos.

1.3 Consideraciones de 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 (43)

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 (44).
- 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 (44).

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 (44).
- 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 (44).

1.4 Técnica de extracción en productos naturales.

1.4.1 Extracción por ultrasonido (Sonificación).

El ultrasonido es un proceso que utiliza la energía de ondas sonoras que son transmitidas en frecuencia superior a la capacidad auditiva del oído humano. Estas ondas sonoras crean una variación en la presión del líquido generando cavitación.

La eficiencia de la extracción usando esta técnica, se cita como igual o mejor que la obtenida con el extractor Soxhlet y se plantea como ventajas, la alta reproducibilidad, la posibilidad de utilización para una amplia gama de tamaños de muestra y el bajo costo.

Parámetros influyentes en el método de extracción por ultrasonido: tiempo de extracción, polaridad del disolvente, cantidad de muestra, tamaño de partículas, relación masa-droga/ volumen de disolvente (45).

1.5 Consideraciones analíticas.

I.5.1 Cromatografía líquida de alta precisión (CLAE).

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. (45, 46 y 47).

1.5.2 Técnicas analíticas para las lactosas sesquiterpénicas.

Las técnicas cromatográficas requeridas para la separación óptima y la identificación o aislamiento de compuestos individuales.

La técnica HPLC puede ser desarrollada cuando el análisis por cromatografía gaseosa de compuestos polares y/o termolábiles se dificulta realizar. Las aplicaciones del HPLC en el análisis de compuestos volátiles pueden ser clasificados en tres grupos:

- 1- Prefraccionamiento de mezclas volátiles complejas previo a la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa.
- 2- Detección cualitativa y cuantitativa de constituyentes volátiles específicos.
- 3- Aislamiento semipreparativo o preparativo de compuestos volátiles.

La técnica HPLC es a menudo usada con prefraccionamiento de mezclas complejas entre grupos de compuestos para simplificar el análisis de cromatografía gaseosa acoplada a espectrofotometría de masa. Usando los materiales en fase reversa RP18, el fraccionamiento es realizado de acuerdo a la polaridad y a la cadena de los constituyentes del aceite esencial. El uso de una columna en fase reversa involucra solventes acuosos, método isocrático o elución con gradiente utilizando detección ultravioleta.

Separación analítica de sesquiterpenos por CLAE (48).

Muestra	Columna	Detección
Solanum tuberosum	μ BondapaKC(10 μ m) (30 cm. * 4.6mm)	225 nm
Hidrocarburos sesquiterpenos, Acoholes sesquiterpenos	Nucleosil 5 (7 μ m) LiChrosorb RP18 (10 μ m) Sobas C14 (7-8 μ m) (25cm*3.9mm)	220nm

1.5.3 Aplicación de la cromatografía líquida de alta eficacia para el análisis y aislamiento de las lactonas sesquiterpénicas.

La capacidad de la cromatografía líquida de alta eficacia usando columnas ODS - Ultraesfera y un gradiente de acetonitrilo agua para separar lactonas sesquiterpénicas ha sido estudiado. El tiempo de retención y los factores de capacidad de 33 compuestos de pseudoguayanólidos y santanolidos presentes en el *Parthenium schttii* contienen, una mezcla de lactonas sesquiterpénicas han sido analizados y separados usando el sistema de cromatografía líquida de alta eficacia. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Columna Ultraesfera – ODS (150 · 4.6mm) o una columna preparativa Ultraesfera – ODS (250 · 10mm) equipado con una precolumna (45 · 4.6mm). Se utilizo un detector UV de 215 nm.

La elusión fue desarrollada usando acetonitrilo y agua el gradiente de elusión fue el siguiente: 0-20 min., 10-25 % Un (gradiente lineal); 24-27 min., 25-40 % Un (gradiente lineal); y 40 % mantenido después de 27 min. La razón de flujo fue de 1ml/min. para las columnas preparativas.

Los estándares fueron disueltos en metanol y aplicados en la columna 100g de muestra del material seco fueron extraídos en 500ml de cloroformo usando una maquina sacudidora por 5 min. El filtrado fue evaporado y disuelto en 100ml de metanol.

La partenina bajo estas condiciones presenta un tiempo de retención de 18.8 y un factor de capacidad de 8.53. (49).

1.5.4 Aplicaciones del CLAE

Dentro de las aplicaciones del CLAE se encuentra el aislamiento de productos naturales.

Existen reportes recientes de su aplicación, en la determinación cuantitativa de metabolitos secundarios.

En la separación de los sesquiterpenos se emplean columnas con fases estacionarias Alltech RSil Silica D, TSK- gel ODS – 12OT, dimensiones de 250 · 10 mm y 300 · 7.8 mm y fases móviles nC₆H₁₄ – TBME 9:1 Ciclohexano – TBME 92:8 y MeOH – H₂O 2:1. Se ha desarrollado en prefraccionamiento

Otro ejemplo reciente de la aplicación de esta técnica se reporta en el prefraccionamiento de un aceite esencial empleando las siguientes condiciones cromatográficas Columna: LiChroprep RP-18 (40 μ m) (240 · 10 mm). Fase móvil: MeOH – H₂O 82.5: 17.5 MeOH
Flujo: 8ml/min. Detector: 220nm. (51).

1.5.5 Comprobación de linealidad en técnicas de análisis cuantitativo.

Se define como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo determinado, puede efectuarse tanto sobre muestras problemas como soluciones patrón que contengan concentraciones crecientes de analito efectuándose posteriormente en tratamiento matemático de los resultados (52 y 53).

En primer lugar, conviene cerciorarse de que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental es más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar, seguidamente se debe preparar una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes. El número de soluciones patrón puede estar comprendido entre 3-10, y el intervalo de concentración se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito de la muestra.

- ✓ Valoración de una materia prima: se analiza de 3-5 soluciones patrón a un intervalo de concentración de 80-120 % de la teórica.
- ✓ Valoración de un principio activo en un producto acabado: se analiza de 5-7 soluciones patrón con un intervalo de concentración de 50-150 % de la teórica.

Se efectúa el análisis siguiendo exactamente en procedimiento descrito, al menos por duplicado y se determina la curva de calibración que relaciona respuesta con concentración o cantidad de analito.

La ecuación de la recta es la siguiente:

$$Y = bx + a$$

donde:

Y- respuesta

B - valor de la pendiente

X - concentración

A - término independiente

Finalmente se realiza el tratamiento estadístico de los datos para evaluar la linealidad y la proporcionalidad mediante los siguientes parámetros:

Coefficiente de correlación (r): refleja el grado de correlación entre las variables **x** (concentración) e **Y** (respuesta). Su valor máximo es 1, si **r** es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. En análisis químico se obtienen valores de **r** iguales o superiores a 0.999 (52 y 53).

Fórmula para hallar r:

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X}) * (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 * \sum (Y - \bar{Y})^2}} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X * \sum Y}{n}}{\sqrt{\left[\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n} \right] * \left[\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n} \right]}}$$

Coefficiente de variación de los factores respuesta (CV_f): Es la relación entre la lectura y la concentración. Para una concentración determinada, el factor de respuesta puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado a esta concentración. En una correlación lineal los factores de respuesta deben ser semejantes y cercanos al valor de la pendiente, por este motivo puede tomarse el coeficiente de variación de los factores de respuesta como una expresión de la linealidad. Un coeficiente de variación superior al 5 % indican falta de linealidad (52 y 53).

$$CV_f = \frac{S_f}{f} * 100$$

donde:

f - Factor de respuesta. $f_i = \frac{Y}{X}$

f - Media de f. $\bar{f} = \frac{\sum f}{n}$

S_f - Desviación standard de $f = \sqrt{\frac{\sum (f_i - \bar{f})^2}{n-1}}$

Cv_f - Coeficiente de variación de los factores respuesta.

n - número de factores respuesta.

Desviación standard relativa de la pendiente ($S_{b_{rel}}$): que es usado como expresión matemática de la linealidad. Valores superiores al 2 % Indican falta de linealidad (52 y 53).

$$S_{b_{rel}}(\%) = \frac{S_b}{b} \cdot 100$$

$$S_b = \sqrt{S_b^2}$$

$$S_b^2 \frac{S_{y,x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2} = \frac{S_{x,y}^2}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum (X - \bar{Y})^2 - \frac{[\sum (X - \bar{X}) * (Y - \bar{Y})]^2}{\sum (X - \bar{X})^2}}{n-2} = \frac{\sum Y^2 - a \sum Y - b \sum XY}{n-2} = \frac{\sum (Y - \bar{Y})^2}{n-2} (1-r^2)$$

donde:

S_b - desviación estándar de la pendiente.

S^2 - varianza de la pendiente.

$S_{y,x}^2$ - varianza del error experimental total.

N - numero de determinaciones ($n = N \cdot K$).

r^2 - número de series o puntos.

N - número de réplicas o curvas.

Límites de confianza del término pendiente.

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión :

$\mathbf{b} \pm \mathbf{t} \cdot \mathbf{Sb}$ siendo t valor de la distribución de student para $n - 2$ grados de libertad y a la probabilidad escogida, generalmente $p = 0.05$.

Otro test estadístico de \mathbf{b} se deduce de la expresión:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{Sb}$$

En la tabla de t se halla el grado de significación para $n-2$ grados de libertad.

Interpretación de los resultados:

- ✓ Si $t_{\text{exp.}} > t_{\text{tab.}}$ se cumple la hipótesis alternativa $\mathbf{b} \neq 0$
- ✓ Si $t_{\text{exp.}} < t_{\text{tab.}}$ significa que la recta es paralela al eje de las abscisa y no habría regresión.

Test de proporcionalidad

El valor de la pendiente (a), indica el error sistemático del método. Estos límites deben incluir al cero para que se cumpla la condición de proporcionalidad. (53)

$$a \pm t \times Sa \quad Sa = \sqrt{Sa^2} \quad Sa_{\text{rel}} = \frac{Sa}{a} * 100$$

$$Sa^2 = Sb^2 * \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S_{y,x}^2}{\sum X^2 * \frac{(\sum X)^2}{n} * n} * \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S_{y,x}^2}{\sum (X - \bar{X})^2} * \frac{\sum X^2}{n}$$

donde:

t - Valor de la distribución de student para $n-2$ grado de libertad.

n - Número de determinaciones.

Sa^2 - Varianza del término independiente.

Sa - Desviación estándar del término independiente.

Sa_{rel} - Desviación estándar relativa del termino independiente.

II. MATERIALES Y METODOS.

2.1 Caracterización tecnológica del sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn.

2.1.1 Análisis granulométrico.

- Materiales, utensilios y medios de medición.
 - Sólido pulverulento.
 - Vibrador de tamices, Marca MLW, Alemán.
 - Tamices de 0,18; 0,125; 0,10; 0,063; 0,045 mm.
 - Balanza Técnica, Owlabor, error 0,01 g, LSP 160 g.

Se empleó para la realización de este estudio el sólido pulverulento obtenido a partir de las partes aéreas de la planta, secadas, molinadas y tamizadas hasta la obtención de un polvo con un tamaño de partícula de 0.315 mm.

El análisis granulométrico se realiza por el método de tamizaje. Se pesan 100 g de la masa de sólidos pulverulentos. 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 rev/min. durante 15 minutos. Seguidamente, se pesan nuevamente los tamices y se calcula la fracción retenida en cada uno. Las determinaciones se realizaron por triplicado (38).

2.1.2 Densidad aparente.

- Materiales, utensilios y medios de medición.
 - Sólido pulverulento.
 - Balanza técnica, Owlabor, error 0,01 g, LSP 160 g.
 - Probeta graduada de 100 ml.

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. (38)

La densidad aparente fue determinada a través de la expresión:

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

donde:

da - Densidad aparente (g/cm³)

m - Masa de la muestra (g)

V - Volumen que ocupa la masa de la muestra (cm³)

n - Cantidad de determinaciones realizadas

2.1.3. Densidad real.

- Materiales, utensilios y medios de medición.

- Sólido pulverulento.

- Agua destilada.

- Picnómetro de 25 ml.

- Balanza Técnica, Owlabor, error 0.01 g, LSP 160 g

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:

$$V_s = \frac{(M_p + 1g) - (M_o + 1g)}{\rho_s}$$

donde:

V_s - Volumen de solvente (cm^3)

M_p - Masa del picnómetro con solvente (g)

M_o - Masa del picnómetro (g)

ρ_s - Densidad del solvente (g/cm^3)

y la densidad real:

$$d_r = \frac{1g}{V_p - V_s}$$

donde:

d_r - Densidad real (g/cm^3)

V_p - Volumen del picnómetro (cm^3)

V_s - Volumen de solvente (cm^3)

Las determinaciones se realizan por triplicado. (38)

2.1.4 Porosidad.

Se determina mediante la correlación entre la densidad aparente y la densidad real, a través de la ecuación de Martín: (38)

$$e = \left(1 - \frac{d_a}{d_r}\right) \cdot 100$$

donde:

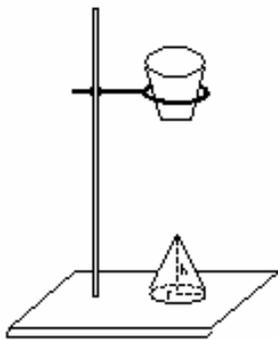
e - Porosidad (%)

d_a - Densidad aparente (g/cm^3)

d_r - Densidad real (g/cm^3)

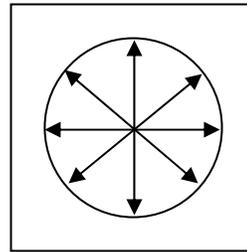
2.1.5 Ángulo de reposo.

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.



a)

Dispositivo



b)

Ilustración de los 8 radios Promedios

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

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

donde:

α - Ángulo de reposo.

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

r - Radio (cm.).

Las determinaciones se realizan por triplicado. (38)

2.1.6 Velocidad de flujo.

- Materiales, utensilios y medios de medición.
 - Sólido pulverulento.
 - Soporte universal.
 - Embudo liso de vástago corto.
 - Cronómetro, Slava.

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 (1,2cm) y un ángulo de inclinación de 45°. Se coloca en él una cantidad definida de muestra (50g), se deja caer y se determina 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:

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

donde:

Vf - Velocidad de flujo (g/cm² s)

G - Masa de la muestra (g)

d - Diámetro del vástago (cm)

t - Tiempo (s)

Las determinaciones se realizan por triplicado. (38)

2.1.7 Humedad residual.

Materiales, utensilios y medios de medición.

- Sólido pulverulento.
- Pesafiltros.
- Balanza analítica LSP 120 g; VD 0,1mg.
- Estufa.

- Desecadoras con Sílica gel activada.
- Pinzas.

Método gravimétrico:

Se pesa 1,0 g con un error máximo de 0,5 mg, se transfiere a un pesafiltro previamente tarado y se deseca a 105 °C durante 3 horas. El pesafiltro se pasa a una desecadora donde se deja enfriar a la temperatura ambiente y se pesa, se coloca nuevamente en la estufa 1h; se repite esta operación hasta obtener una masa constante.

El contenido de humedad (H) expresado en por ciento se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$H = \frac{M_2 - M_1}{M} \cdot 100 (\%) m / m$$

donde:

M₂ - masa del pesafiltro con la muestra (g)

M₁ - masa del pesafiltro con la muestra de ensayo desecada (g)

100 - factor matemático para los cálculos

Las determinaciones se realizan por triplicado. (54)

2.2 Determinación del intervalo lineal de la técnica de Cromatografía Líquida de alta eficacia aplicable en la determinación de partenina en los sólidos pulverulentos de la planta.

- Materiales, equipos y reactivos.

- Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Agilent 1100 Series, utilizando un lazo de inyección 20µL.
- Balanza Analítica, BOECO. Germany.
- Baño ultrasónico, BRANSON 1510. México.
- Rotavapor, BUCHI, R-200. Alemán.
- Filtro 0.45 µm RC. Agilent Technologies.
- Micropipeta, LABMATE. Poland.
- Cristalería de laboratorio.

- Sólidos pulverulentos.
- Patrón de análisis (partenina).
- Metanol.

Se realizó la determinación de la linealidad de la técnica CLAE de análisis, validada en una investigación colateral (56) con vistas a su aplicación en la determinación de partenina en los sólidos pulverulentos de la planta, desarrollándose la adecuación del intervalo lineal del método analítico atendiendo a las respuestas obtenidas al aplicar el procedimiento de muestra propuesto en el presente trabajo. La comprobación del cumplimiento de la linealidad, en el intervalo de concentraciones de 25 a 125 mg/L (0,025 a 0,125 mg/mL), posibilitó la cuantificación de la concentración de partenina a tiempo cero y en las restantes determinaciones realizadas, al evaluar la influencia de factores tales como la humedad, luz y temperatura en la concentración de partenina.

❖ **Linealidad.**

Preparación de la solución patrón (2,5 mg/mL).

Se pesan con exactitud 5,000 mg, se introducen en un matraz aforado de 2 mL y se adiciona metanol hasta completar volumen obteniéndose una solución de concentración de 2,5 mg/mL.

Preparación de las soluciones de ensayo.

Se prepararon cinco muestras de concentraciones crecientes conocidas a partir de la solución inicial de concentración 2,5 mg/mL, estas son las siguientes: 25 mg/L (0,025 mg/mL), 50 mg/L (0,05 mg/mL), 75 mg/L (0,075 mg/mL), 100 mg/L (0,1 mg/mL), 125 mg/L (0,125 mg/mL).

Se toman con exactitud de la solución de concentración 2,5 mg/mL, volúmenes: 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L, se colocan en matraces aforados de 10 mL y se completa el volumen con una mezcla acetonitrilo-agua (40:60), obteniéndose así las concentraciones señaladas anteriormente.

Procedimiento.

Se realizan tres curvas de calibración de cinco puntos, con tres réplicas para cada valor de concentración. Estos datos se procesan mediante el tabulador electrónico EXCEL, para obtener los resultados de la pendiente (b), el término independiente (a) y el coeficiente de correlación (r). El coeficiente de variación de los factores respuesta (CV_f), la desviación estándar relativa de la pendiente ($S_{b\ rel}$) y los límites de confianza del término independiente se obtienen a través de las fórmulas descritas en el epígrafe (1.5.5).

Preparación de la solución patrón de partenina. (2,5mg/mL).

El procedimiento coincide con el reportado en la comprobación de la linealidad de la técnica de análisis descrito con anterioridad.

Preparación de la solución patrón de partenina. (0,075 mg/ml).

Se pipetea una alícuota de 300 μ L de la solución patrón de partenina de 2,5mg/mL y se lleva a un matraz aforado de 10 mL y se completa el volumen con una mezcla acetonitrilo – agua (40:60) obteniéndose una solución de concentración 0,075 mg/mL.

Preparación de la muestra.

Se pesan 0.1g de material vegetal y se colocan en erlenmeyer con 8 mL de metanol. La muestra se introduce en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Se filtra y se lava con 3 mL de metanol, se repite la extracción. Se reúnen los filtrados concentrándose a vacío y se redisuelven en 4ml de metanol. La suspensión se filtra por miliporo de 0,45 μ m y se inyecta en el instrumento 20 μ l de esta solución.

Procedimiento.

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

- Fase estacionaria: LiChrospher RP- 18 (5 μ m) (4.6 *250 nm)
- Fase móvil: acetonitrilo – agua (40: 60).
- Flujo: 1 ml/min.
- Detector: de landa variable.
- Longitud de onda de detección: 210 nm.

Expresión de los resultados.

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

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

A_p : Area bajo la curva del patrón.

A_m : Area bajo la curva de la muestra.

C_m : Concentración de la muestra.

C_p : Concentración del patrón.

La determinación de la concentración del principal ingrediente activo se realiza en base seca, al considerar un % de humedad residual correspondiente a un valor de 10 % y se determina a través de la expresión:

La concentración de partenina en el material vegetal, se determinó a partir de la curva de calibración expresada en mg/L, efectuándose la conversión a las unidades de mg/mL para calcular el porcentaje del componente principal. La deducción de la expresión para el cálculo del porcentaje de partenina en base seca se realizó teniendo en consideración este criterio.

$$\%p = 40 \cdot a \cdot \frac{100}{100 - \%p\acute{e}rdida}$$

donde:

% p: Por ciento de partenina en base seca.

a: Concentración obtenida de la curva de calibración en mg/mL.

% pérdida: Humedad residual (%).

40: Factor de corrección.

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

- Materiales, equipos y reactivos.

- Sólidos pulverulentos.
- Balanza Analítica BOECO. Germany.
- Desecadoras con Sílica gel activada.
- Acido Sulfúrico 98 %. Panreac Química SA.
- Cristalería de laboratorio.

2.3.1 Influencia de la Humedad.

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

Humedad Relativa (%)	Concentración de H ₂ SO ₄ (%)
47,2	45,35
70,4	33,33
97,5	7,45

En cada desecadora se colocan tres réplicas de cantidades de sólidos pulverulentos, pesadas 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, sabor 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 (CLAE) para determinar el contenido de su principal ingrediente activo, la partenina (56).

Fundamento del método.

El método se basa en la separación de la partenina del resto de los componentes extraídos del sólido pulverulento, a través de una columna para HPLC, rellena con fase estacionaria LiChrospher- 100 RP- 18, fase móvil acetonitrilo - agua en mezcla (40: 60), flujo de 1 mL/min y su detección para la cuantificación mediante detector de longitud de onda variable, a una $\lambda = 210$ nm.

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

2.3.2 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 natural; 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, sabor 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.

2.4 Pruebas fisicoquímicas desarrolladas en la etapa de preformulación en los sólidos pulverulentos.

2.4.1 Higroscopicidad.

- Materiales, utensilios y medios de medición.
- Sólido pulverulento.

- Balanza Analítica Boeco. Germany.
- Pesafiltros.
- Desecadoras.
- Ácido Sulfúrico 98 %. Panreac Química SA.

La higroscopicidad se evalúa por el método de Callaghan et. al. (1982) basado en el almacenamiento a 25°C por 24 horas a 80% de humedad relativa (33).

Se pesan 0,1 g de sólido pulverulento, en pesafiltros (por triplicado), se toma el peso inicial de los mismos con la muestra, se colocan en una desecadora a 80% de humedad relativa durante 24 horas, terminado el tiempo se realiza la determinación gravimétrica.

2.4.2 Dinámica de la adsorción de vapor.

La evaluación de la dinámica de adsorción se desarrolla pesando 0,1 g de los sólidos pulverulentos en pesafiltros colocados en desecadoras a diferentes por cientos de humedad 8,5 %; 18,2%; 37,1 %; 47,2 %; 58,3%; 70,4 %; 80,5 %; 88,8 %; 93,9 % y 97,5 % (Anexo I). Se evalúa la ganancia de humedad al realizar pesadas consecutivas hasta peso constante.

El comportamiento de la desorción de la muestra analizada, se realiza pesando 0,1 g de los sólidos pulverulentos en pesafiltros colocados en desecadoras a HR de 97,5 % hasta alcanzar peso constante, siendo ubicados en los ambientes de humedad anteriores hasta lograr estabilización del peso. Se realiza a continuación, en ambos casos, las determinaciones gravimétricas correspondientes. (33)

2.4.3 Estabilidad en fase sólida.

- Materiales, equipos y reactivos.
 - Sólido pulverulento.
 - Balanza Analítica Boeco. Germany
 - Viales de cristal.
 - Acido Sulfúrico 98 %. Panreac Química SA.
 - Desecadoras
 - Estufa con temperatura 40 °C.

El compuesto es exactamente pesado dentro de los viales de cristal (6 réplicas), los cuales son colocados en duplicados bajo las siguientes condiciones: 40°C / 75 % de humedad relativa y 30°C/ 60 % de humedad relativa.

Las muestras son colocadas durante un mes, efectuándose una evaluación de la estabilidad química y física del compuesto principal cada 15 días. El procedimiento seguido en el análisis químico es descrito en el epígrafe 2.2.

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos al evaluar la influencia de los factores incidentes en la estabilidad de los sólidos pulverulentos de la planta (humedad, luz y temperatura) fue desarrollado según el STATGRAPHICS versión 5.0. Se realizó un análisis de varianza simple en la comparación de las variantes evaluadas para cada estudio, con la correspondiente aplicación del test no paramétrico de Kruskal- Wallis cuando es rechazada la igualdad de varianza en los casos analizados.

2.5. Formulación y elaboración de los granulados.

Variantes de formulaciones ensayadas.

Sólido pulverulento-----30%, 40%, 50%.Componente activo.

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

Lubricantes----- 3%.

Lactosa c.s.p.----- 100% Vehículo.

Se emplea como aglutinante, el acetofalato de celulosa al 12,5 % en etanol-acetona (3:1), ensayando por tanto un total de 3 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 sólido pulverulento, desintegrante y vehículo.
- 5- Preparar la solución aglutinante.
- 6- Adicionar poco a poco la solución aglutinante a la mezcla de polvos,

- Hasta obtener la consistencia adecuada.
- 7- Granular por tamiz de 1,2 mm.
 - 8- Secar en estufa a 40 grados.
 - 9- Regranular por tamiz de 1 mm.

2.6 Caracterización tecnológica de los granulados obtenidos a partir del *Parthenium hysterophorus*, Linn.

- Materiales, utensilios y medios de medición.
 - Vibrador de tamices, Marca MLW, Alemán.
 - Tamices de 0,71; 0,5; 0,355; 0,25; 0,18; 0,125; 0,10; 0,063; 0,045.
 - Balanza Técnica, Owlabor, error 0,01 g, LSP 160 g.
 - Cronómetro, Slava.
 - Granulados de *Parthenium hysterophorus*, L.
 - Cristalería común de laboratorio.

La caracterización de los granulados incluye los siguientes aspectos:

(a) *Análisis granulométrico.*

Se realiza siguiendo la metodología descrita en el punto 2.1.1.

(b) *Densidad aparente.*

Se efectúa siguiendo la metodología descrita en el punto 2.1.2.

(c) *Densidad real.*

Se ejecuta según el procedimiento propuesto en el punto 2.1.3.

(d) *Porosidad.*

Se lleva a cabo por el mismo método descrito en el punto 2.1.4.

(e) *Ángulo de reposo.*

Se determina siguiendo el método descrito en el punto 2.1.5.

(f) *Velocidad de flujo.*

Se realiza con la misma técnica operatoria descrita en el punto 2.1.6.

(g) *Humedad residual.*

Se lleva a cabo de la misma forma descrita en el punto 2.1.8.

III. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1. Caracterización tecnológica del sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn.

Análisis de la distribución del tamaño del tamaño de partícula.

Como resultado del análisis de la distribución del tamaño de partículas (análisis granulométrico) se evidenció la presencia de un alto por ciento de polvo fino 58,6% (Gráfico #1), considerando polvo fino todas aquellas partículas con tamaño inferior a 0.2 mm (38), esto es debido a la imposibilidad de regular la velocidad del molino utilizado y a las características propias de la muestra. Esto constituye una dificultad pues no favorece sus propiedades reológicas, pudiendo ocurrir su estratificación, durante el desarrollo de una forma de dosificación terminada.

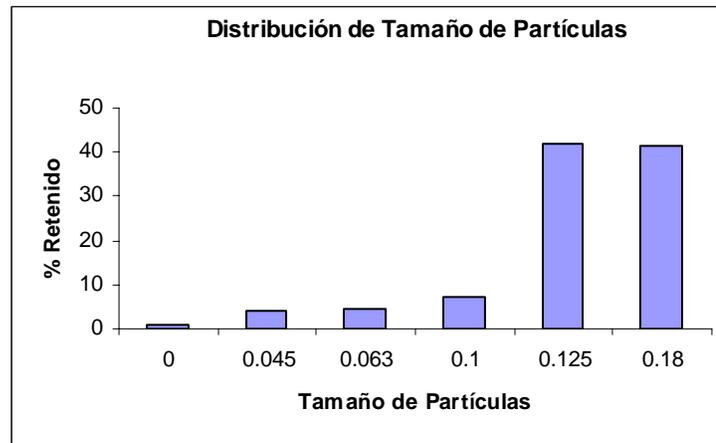


Gráfico # 1. Distribución de tamaño de partículas del sólido pulverulento.

Sólido pulverulento	Densidad aparente (g/cm ³)	Densidad real (g/cm ³)	Porosidad	Angulo de Reposo (°)	Velocidad de flujo (g/cm ² s)
	0.31	0.79	60.76	-	-

Tabla # 1. Valores medios de densidad aparente, real, porosidad, ángulo de reposo y velocidad de flujo del sólido pulverulento.

Los resultados mostrados en la tabla #1 coinciden con los reportados en la bibliografía consultada para materiales vegetales en forma de sólidos pulverulentos (42 y 58), como se puede apreciar, la densidad real es muy superior a la aparente, lo que da un criterio de la compresibilidad del sólido pulverulento y da la medida de la alta capacidad de empaquetamiento que presenta el material, lo que puede ser una de las causas de que el sólido pulverulento no fluyera y por tanto no se pudieron determinar por las metodologías empleadas, ni la velocidad de flujo ni el ángulo de reposo. Otros aspectos que pueden haber incidido en las deficientes propiedades reológicas del producto en estudio, son la forma irregular de sus partículas y el alto % de polvo fino demostrado en el experimento anterior, que puede obstruir el orificio de salida del equipo que se utiliza para la determinación de estos parámetros. Además hay que tener en cuenta que se trabajó con un material vegetal clasificado como ligeramente higroscópico por lo que puede captar humedad ambiental, compactarse, formar arcos ó bóvedas y de esta forma se dificulta su fluidez.

Tabla #2. Resultados de la humedad residual determinados por el método gravimétrico.

Sólido pulverulento.	Humedad residual (%).
SP. Réplica 1	10,3
SP. Réplica 2	9,8
SP. Réplica 3	9,9
SP. Promedio	10,0

Leyenda: SP. Sólido pulverulento.

El valor de humedad residual promedio del sólido pulverulento obtenido (tabla # 2), es similar al reportado anteriormente para esta planta que fue del 9% (42). Además la literatura plantea que el contenido de humedad residual de una droga vegetal se debe encontrar entre un 8 -14% (57), por lo que se consideran adecuados los resultados obtenidos.

3.2 Determinación del intervalo de linealidad aplicable en la cuantificación de partenina, ingrediente activo principal a partir de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn.

El análisis de las réplicas realizadas a las curvas de calibración en el intervalo de concentraciones de 25 a 125 mg/L (0,025 a 0,125 mg/mL), permitió la obtención del modelo matemático definido por la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 10,914x + 1,4442$$

donde :

x: concentración del analito expresado en mg/L.

y: respuesta (área bajo la curva).

Los resultados obtenidos para las réplicas analizadas en el rango de concentraciones evaluado se muestran en la tabla # 3.

Tabla # 3. Resultados obtenidos al evaluar linealidad en el rango de concentraciones de 25 a 125 mg/L (0,025 a 0,125 mg/mL).

Concentración (mg/L)	Area 1	Area 2
25	285,4	285,4
50	515,0	514,0
75	828,7	830,4
100	1179,3	1179,0
125	1340,0	1339,0

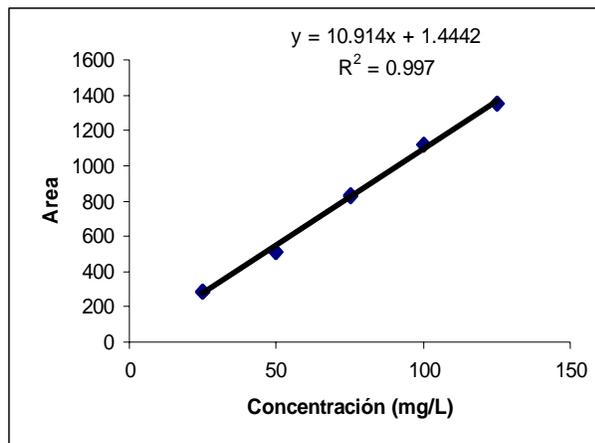


Gráfico # 2. Curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 25 a 125 mg/L (0,025 a 0,125 mg/mL).

A través de los cálculos estadísticos realizados, partiendo de la regresión lineal se obtuvieron los datos que se muestran en la Tabla # 4.

Tabla # 4. Resultados de la linealidad en el intervalo de concentraciones de 25 a 125 mg/L (0,025 a 0,125 mg/mL).

Valor reportado	r	CVf %	Sbrel %	a±Sat
Valor calculado	0,9985	4,41	0,79	-14,22 a 17,10
Criterio	0,9900	5,00	2,00	Contener 0

donde:

r: Coeficiente de correlación lineal.

CV_f: Coeficiente de variación de los factores respuesta.

Sb_{rel}: Desviación estándar relativa de la pendiente.

a±Sat: Intervalo de confianza para el intercepto.

Se puede observar en la tabla # 4 que todos los resultados cumplen con lo establecido para este parámetro por lo que la técnica es lineal.

3.3 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:

Tabla # 5. 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
70,4	1,02
97,5	3,37

Como puede observarse en la tabla # 5 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 ligera higroscopicidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por León en 1999. (42)

b) Características organolépticas.

El sólido pulverulento presentó un color verde olivo claro, un olor característico y penetrante, un sabor amargo y las partículas tuvieron una forma un poco irregular.

c) Análisis químico.

Los resultados obtenidos en la cuantificación del principio activo en los sólidos pulverulentos a tiempo cero (t_0) arrojan un valor de 2.79 % en base anhidra. El contenido de la lactona sesquiterpénica en los 3 ambientes de humedad evaluados a los 15 días 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 # 6.

Tabla # 6. 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	2,79	1,88
7,4	2,79	1,83
97,5	2,79	1,78

En el anexo II.1 se muestra el cromatograma obtenido a tiempo cero En los anexos II.2, II.3 y II.4 se muestran los cromatogramas correspondientes a cada ambiente de humedad.

La interpretación teórica de la posible influencia de la humedad en la estabilidad química de la partenina se justifica atendiendo a la probable hidrólisis del grupo α β lactona insaturado, rindiendo dos productos principales de degradación: el alcohol y el ácido α β insaturado correspondiente.

Influencia de la luz.

a) Características organolépticas.

No se experimentaron variaciones físicas en el sólido pulverulento.

b) Análisis Químico.

Los resultados del análisis químico realizado en este estudio se muestran en la tabla # 7.

Tabla # 7. 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 t₀ (%)	Concentración (%)
Frasco incoloro	2,79	0,98
Frasco ámbar	2,79	1,30

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 IV.1 y IV.2 se muestran los cromatogramas correspondientes a cada condición de envase.

La degradación fotolítica del componente principal se encuentra justificada debido a que la luz podría ejercer acción sobre los sistemas insaturados de la estructura química, lo cual corrobora la marcada incidencia de este factor en la concentración de partenina obtenida.

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 contengan. Se sugiere almacenar el sólido pulverulento en un envase secundario de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis químico, con vistas a su protección de otros factores incidentes en la estabilidad de su principal componente activo.

3.4 Pruebas fisicoquímicas desarrolladas en la etapa de preformulación.

3.4.1 Higroscopicidad.

Los resultados del estudio de higroscopicidad, realizado por el método descrito por Callaghan et al 1982 (33), se aprecian en la tabla # 8.

Tabla # 8. Resultados obtenidos al evaluar la ganancia de humedad del sólido pulverulento almacenado a 25 °C por 24 horas a 80 % de humedad relativa

P. Cestillo vacío	P. Cestillo + droga	24 horas	Ganancia de humedad (%)
0,0889	0,5889	0,5911	0,22
0,1336	0,6336	0,6465	1,29
0,1336	0,9830	0,9993	1,63
Media			1,05

Como puede apreciarse la ganancia de humedad del sólido pulverulento tiene un valor medio de 1,05 % el cual se encuentra en el intervalo comprendido entre 0,2 y 2,0 %, siendo clasificado como ligeramente higroscópico, según la literatura especializada consultada (33).

3.4.2 Dinámica de la adsorción de vapor.

La evaluación de la dinámica de adsorción- desorción del sólido pulverulento muestra una tendencia al comportamiento típico de dichos fenómenos físicos reportados en la literatura especializada (33). Como se evidencia en el gráfico # 4 a medida que se incrementa la humedad relativa se produce un incremento de la ganancia en peso de la muestra analizada. Al evaluar la desorción del polvo a medida que disminuye el por ciento de humedad relativa, se produce una reducción paulatina del peso.

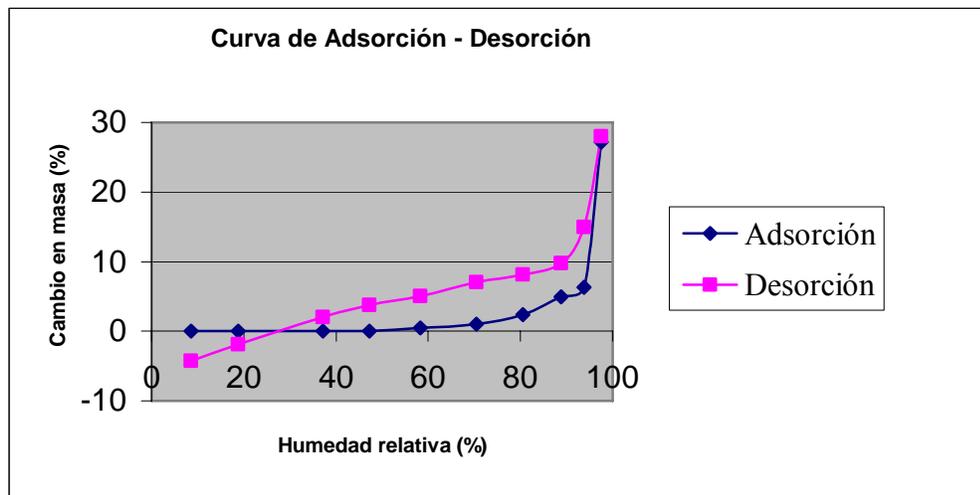


Gráfico # 4. Dinámica de adsorción-desorción del sólido pulverulento para los ambientes de humedad evaluados.

3.4.3 Estabilidad en fase sólida del sólido pulverulento.

De acuerdo a las exigencias establecidas (33) se evaluaron las condiciones de 75 % de humedad relativa a 40 °C y 60 % de humedad relativa a 30 °C, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla # 9.

Tabla # 9. Evaluación de la estabilidad en fase sólida del sólido pulverulento bajo las condiciones experimentales establecidas.

	Tiempo de evaluación	Area bajo la curva	Concentrac. t0 (%)	Concentrac. (%)
HR 60% temp 30 °C	1ra (15 días)	577,06	2,79	2,34
	2da (30 días)	531,6	2,79	2,16
HR 75% temp 40 °C	1ra (15 días)	540,0	2,79	2,19
	2da (30 días)	497,2	2,79	2,02

En los anexos VI.1, VI.2, VI.3, y VI.4 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada condición señalada anteriormente.

Al realizar la comparación de ambas condiciones evaluadas a los 15 días, se aprecia una reducción significativa de la concentración de ingrediente activo en las muestras sometidas a 75 % de humedad relativa y un 40 °C. La concentración de ingrediente activo experimenta una marcada disminución al desarrollarse la evaluación a los 30 días de almacenamiento bajo ambas situaciones experimentales, con una mayor incidencia de la segunda variante ensayada.

El procesamiento estadístico de la evaluación de los factores incidentes en la estabilidad de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, Linn (escoba amarga), tales como la luz, humedad y temperatura, evidencian los siguientes resultados. La evaluación de la influencia de la humedad en la concentración de partenina obtenida al aplicar la técnica de análisis de acuerdo a análisis químico realizado, revela la existencia de diferencias significativas entre los ambientes de humedad evaluados comparados con la concentración del ingrediente activo a tiempo cero. No se apreciaron diferencias significativas entre los

ambientes de humedad correspondientes a un 70.4 % y 97.5 %. Los anteriores resultados demuestran la influencia de la humedad en la estabilidad química de la partenina (AnexoIII). En la evaluación de la influencia de la luz, se evidenciaron marcadas diferencias significativas al realizar la comparación entre los grupos individuales (frascos ámbar y transparentes). Al comparar las variantes analizadas con relación a la concentración a tiempo cero, se refleja la existencia de diferencias significativas. Los resultados experimentales obtenidos en dicho estudio al evaluar la afectación del principal componente presente en el polvo almacenado en frascos transparentes, indican una reducción significativa de la concentración de partenina (AnexoV).

En el seguimiento de la estabilidad en fase sólida del sólido pulverulento, se apreciaron diferencias significativas entre las condiciones evaluadas (30°C/ 60% HR y 40°C/ 75% HR) comparadas con la concentración del ingrediente activo a tiempo cero y entre ambas variantes, lo cual demuestra la incidencia más marcada de la segunda condición en la estabilidad química del principal componente presente en el polvo de la planta, donde se emplea una temperatura de 40°C a una humedad relativa de 75% (Anexo VII).

3.5 Formulación y elaboración de los granulados.

Se elaboraron granulados a partir de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L, ya que, como ha quedado demostrado en el presente trabajo, estos sólidos presentan propiedades reológicas deficientes, que limitan su adecuada dosificación. Se escogió como aglutinantes el acetofalato de celulosa al 15% en etanol-acetona 3:1, esta sustancia tiene como característica el ser gastrorresistente, por tanto deben dar como resultado un granulado entérico, de forma que la liberación del principio activo (partenina) no ocurra a nivel estomacal, lo cual es conveniente, ya que el mismo es sensible a sufrir hidrólisis a pH ácido. Considerando que no resultó posible la aglutinación efectiva del sólido pulverulento 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 (30, 40 y 50%), se tuvo en cuenta, que los extractos de plantas medicinales normalmente se usan en concentraciones altas, para lograr la acción terapéutica (59). La concentración del

aglutinante 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 (38)

3.6 Caracterización tecnológica de los granulados obtenidos a partir del *Parthenium hysterophorus*, Linn.

(a) Análisis granulométrico

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

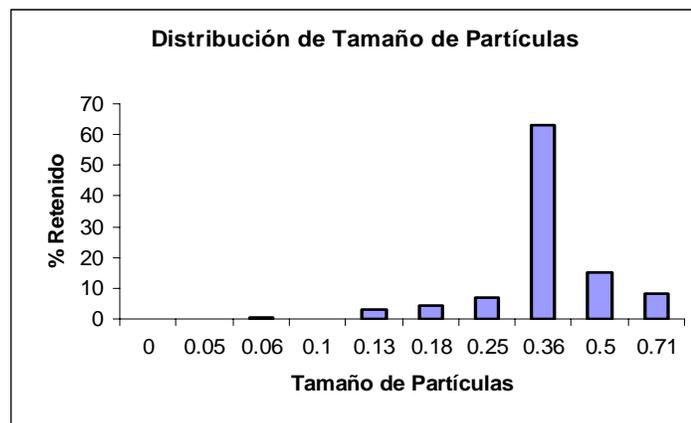


Gráfico # 5. Distribución de tamaño de partículas del granulado con el sólido pulverulento al 30% y el acetofalato de celulosa como agente aglutinante.

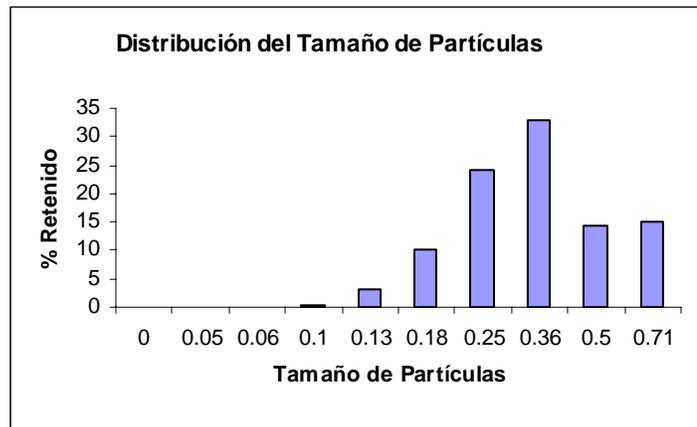


Gráfico # 6. Distribución de tamaño de partículas del granulado con el sólido pulverulento al 40% y el acetofalato de celulosa como agente aglutinante.

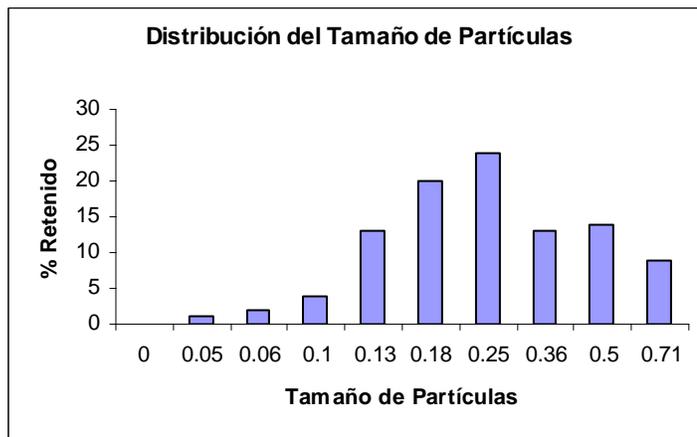


Gráfico # 7. Distribución de tamaño de partículas del granulado con el sólido pulverulento al 50% y el acetofalato de celulosa como agente aglutinante.

Como se puede observar en los gráficos anteriores, los mejores resultados se obtienen en el caso que se empleó el sólido pulverulento al 30 % donde la masa de gránulos tiene una distribución cercana a la normal de tamaño de partículas, con una moda alrededor de los 0,355 mm, mientras que el por ciento de polvo fino, está por debajo del 15% (8,2%), todos

estos aspectos coinciden, con lo reportado en la literatura para un granulado ideal en relación al tamaño de partículas (38). Esto es de esperar, ya que en esta variante de granulado, se utilizó la menor concentración de sólido pulverulento, por otro lado los excipientes empleados son de uso común en formas sólidas de dosificación, con adecuada capacidad para aglutinarse. En la variante donde se emplea el sólido pulverulento al 40% aunque los resultados no son tan buenos en comparación con la anterior, los % obtenidos de polvo fino (13.5%) y de partículas retenidas en el tamiz de 0,355mm (33%), también están dentro de los límites permisibles reportados en la literatura (38), y pudiera considerarse en este sentido, como una variante a emplear en caso de que la dosis que se necesite así lo exigiera. La formulación que presenta el sólido pulverulento al 50 % no cumple con lo reportado por la bibliografía en cuanto a este tipo de estudio (38).

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

Los valores medios de la densidad aparente, real y porosidad de los granulados estudiados se muestran en la tabla # 10.

Tabla # 10. Valores medios de densidad aparente, real y porosidad de los granulados elaborados con acetofalato de celulosa como aglutinante.

Granulados	Densidad aparente(g/cm³)	Densidad real (g/cm³)	Porosidad (%)
SP. 30 %	0.330	1.12	70.54
SP. 40 %	0.301	1.03	70.78
SP. 50 %	0.291	0.877	66.82

Leyenda: SP. Sólido pulverulento.

Los resultados obtenidos en todos los casos se consideran adecuados, pues se acercan en gran medida a los valores ideales reportados en la literatura,(38) 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 sólido pulverulento 30% y el acetofalato 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 # 11. Valores medios de Ángulo de reposo y velocidad de flujo de los granulados elaborados con acetofalato de celulosa como aglutinante.

Granulados	Ángulo de reposo (°)	Velocidad de flujo (g/cm ² s)
SP. 30 %	28,2	8,79
SP. 40 %	34,7	7,25
SP. 50 %	38,0	6,30

Leyenda: SP. Sólido pulverulento.

En la tabla anterior se puede observar que los mejores resultados en este sentido se obtienen al emplear el sólido pulverulento al 30% y el acetofalato de celulosa como aglutinante, ya que se cumple con lo establecido por la literatura (38) para estos parámetros, donde se plantea que un granulado óptimo debe presentar una velocidad de flujo mayor o igual a 7 g/cm².s y un ángulo de reposo menor de 30°. El resto de los granulados estudiados como se

puede apreciar no cumple con estas especificaciones. No obstante, la variante donde se emplea el sólido pulverulento al 40 %, no debe ser descartada, pues la velocidad de flujo da un resultado superior a $7 \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ y el ángulo de reposo aunque no es excelente, puede ser considerado según algunos autores como adecuado (32), además hay que tener en cuenta que las propiedades de flujo de dichos granulados pueden ser mejoradas con el empleo de agentes lubricantes.

(g) *Humedad Residual.*

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

Tabla # 12. Resultados medios de humedad residual de los granulados elaborados con acetofalato de celulosa como aglutinante.

Granulados	Humedad Residual (%)
SP. 30%	8,17
SP. 40%	8,80
SP. 50%	1,02

Leyenda: SP. Sólido pulverulento.

En la tabla # 12 se aprecia la humedad residual para los tres granulados elaborados, cuyos resultados coinciden con lo reportado por León (42), al evaluar la humedad residual de granulados de *Parthenium hysterophorus*, Linn., utilizando como aglutinante la carboximetilcelulosa y la gelatina. En este caso la menor humedad residual la presenta el granulado que emplea el sólido pulverulento al 30% y el acetofalato de celulosa como

aglutinante, coincidiendo con el granulado que mejor fluidez presenta, lo cual fue analizado anteriormente.

Un análisis integral de los resultados obtenidos al evaluar las propiedades físico-químicas y tecnológicas a las diferentes variantes de granulados estudiadas llevan a plantear que la mejor formulación es aquella que presenta el sólido pulverulento al 30%, sin descartar la posibilidad de uso de la formulación que emplea el sólido pulverulento al 40 %, en caso de que razones de dosificación así lo exigieran.

IV. CONCLUSIONES.

- ✓ 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, la luz y la temperatura constituyen factores que influyen en la estabilidad química de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus* Linn.
- ✓ Los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn se clasifican como ligeramente higroscópicos de acuerdo a la alternativa de higroscopicidad evaluada.
- ✓ La curva de adsorción desorción muestra una tendencia al comportamiento típico de dichos fenómenos físicos.
- ✓ Se obtuvo un granulado de forma adecuada, empleando la formulación propuesta, utilizando la granulación húmeda, método tradicional, como técnica de elaboración.
- ✓ El granulado elaborado con el sólido pulverulento al 30 % y el acetofalato de celulosa como aglutinante, teniendo en cuenta los parámetros evaluados, puede ser utilizado en la elaboración de una forma farmacéutica sólida

V. RECOMENDACIONES.

- ✓ Se sugiere almacenar el sólido pulverulento en un envase secundario de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis químico, con vistas a su protección de factores incidentes en la estabilidad de su principal componente activo.
- ✓ Desarrollar y validar una técnica analítica para la cuantificación de la partenina en el granulado, con vistas a los estudios de estabilidad del mismo.
- ✓ Evaluar la influencia de factores incidentes en la estabilidad de los granulados obtenidos de la planta mediante su análisis físico y químico.

VI. BIBLIOGRAFIA.

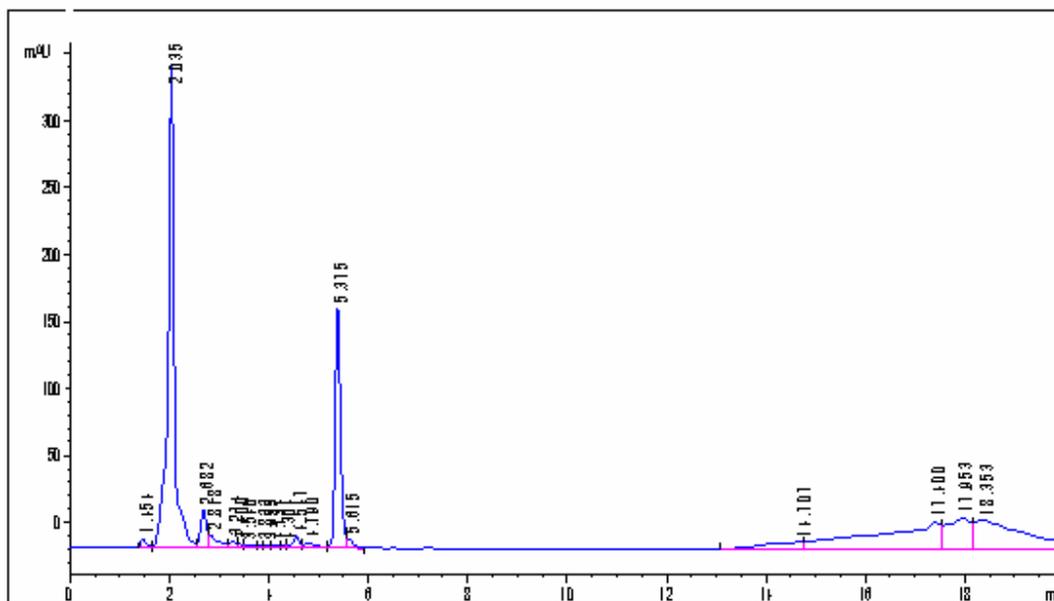
1. Revista Cubana de Farmacia 36 (Suppl. No.2). Editorial Ciencias Médicas: 102, 104, 133: octubre 2002.
2. Roig Juan Tomás y Mesa. “Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba “: 354 – 56; 1974.
3. García Cañizares Felipe. Botánica General y descriptiva: 485; 1975.
4. 6. Research Bulletin of the Panjab University 44 (1): 105 – 49; 1994.
5. Roig Juan Tomás.” Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos “. Tomo (1): 385; 1965.
6. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Plantas medicinales. Fitomed (2). Editorial Ciencias Médicas: 117; 1993
7. Rodríguez García S. “Plantas indeseables en el cultivo de la caña de azúcar “: 196; 1988.
8. Hermano Alain. Flora de Cuba (5): 191 – 92; 1964
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 Gutiérrez 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 sesquiterpene lactones 2. En: Revista Fitoterapia 2: 185 – 86; 1996
13. Sharma G. L; Bhutani K.K.” Plant based antiamebic 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 científica 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 constituents 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 hysterophorus* 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

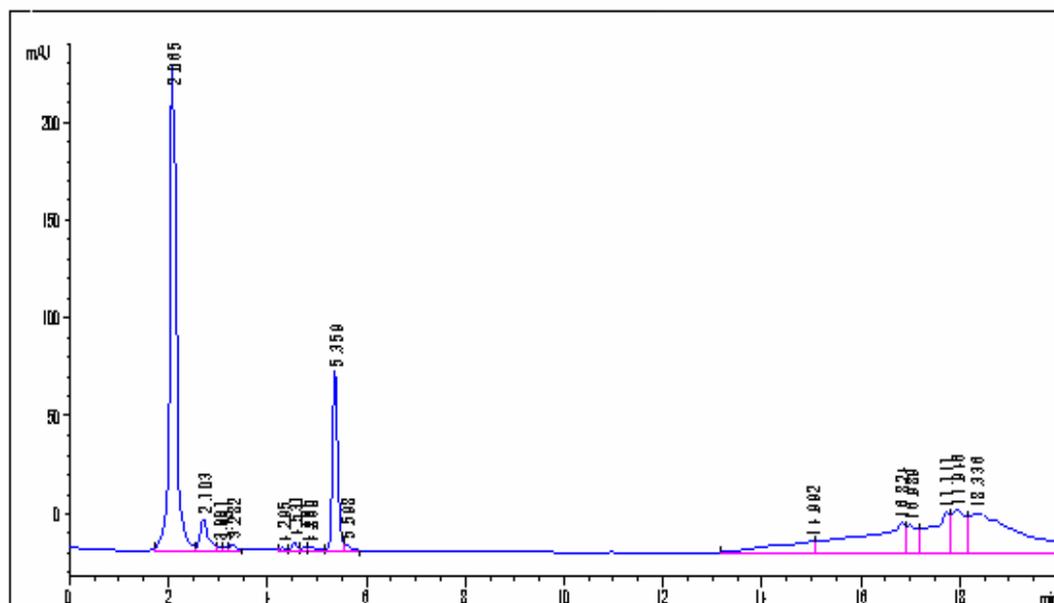
30. From DNP on CD-ROM, Version 14.1. Copyright © 1982-2006 Chapman & Hall/CRC
31. Vila Jato J.L. "Tecnología farmacéutica". Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas 1: 27-70; 1997.
32. Faulí Trillo C. "Tratado de Farmacia Galénica: 77-103; 1993.
33. Steele Gerry. "A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form". En: Pharmaceutical Preformulation and formulation: 23-61,193-194; 2004.
34. Torres, A,L: Estabilidad de Medicamentos. Conceptos fundamentales y causas de inestabilidad. Universidad. Complutense de Madrid: 1-8; 1995.
35. Sbarbatie de Nudelman: Estabilidad de Medicamentos: 36; 1975.
36. Lachman, L: The Theory and Practice of Industrial Pharmacy; 2 da Ed.:52-56; 1976.
37. Kopleman S.H; Augsburger L. "Selected Physical and Chemical Properties of Commercial *Hypericum perforatum* Extracts Relevant for Formulated Product quality and performance". En: AAPS Pham Sci 3(4): 1-17; 2001.
38. 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.
39. Lachman León." The theory and practice of industrial pharmacy": 320 – 21, 327 – 28; 1986.
40. 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.
41. Díaz Pérez Liliam María. " Caracterización de sólidos pulverulentos. Métodos para evaluar propiedades de flujo "; 1995.
42. León Iliana. Evaluación tecnológica del parthenium hysterophorus Linn. Trabajo de diploma. Facultad Química-Farmacia. UCLV. 1999.
43. Sriramarao P; Nagpal. S; Rao D. S. " Immediate hipersensitivity to Parthenium hysterophorus . Clinical studies in the prevalence of Parthenium rhinitis ". En: Clin – Exp – Allergy " 1 (1): 55 – 62; 1991.
44. 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.

45. Toebes AH; De Boer V; Verkieij JA; Lingeman H; Ernst WH. Extraction of isiflavone malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. *J Agric Food Chem.* 2005 Jun 15;53(12):4660-6.
46. Skoog, Douglas A. y Leary, James J.: *Análisis instrumental*. Cuarta edición, P. (674-775), Universidad de Barcelona; 1997.
47. Pradeau,: *Análisis Químico Farmacéutico de Medicamentos*. P. (405); 1998.
48. USP XXIII, 1995, *Farmacopeas: Británica, 1998; Española;1995*.
49. Merfort I. "Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones". En: *Journal of Chromatography A* 967: 115-130; 2002.
50. Bernard M. "Application of High – Performance liqued chromatography for analysis and isolation of sesquiterpene lactones". En: *Journal of Chromatography* 265: 97-104; 1983.
51. Hostettmann et al. "Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation". 2nd Edition, Enlarged Edition: 106; 1997.
52. Center for drug evaluation and research (CDER): "Validation of chromatographic methods". *Reviewer Guidance*: 5-10; 1994.
53. Castro, M. et al: *Validación de métodos analíticos*. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Barcelona: 4-55; 1989.
54. *Normas Ramales de Salud Pública*. Número 309 y 310. *Drogas Crudas*. Métodos de ensayo; 1992.
55. Polín García Livier."Aislamiento, caracterización y cuantificación de la partenina en los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn." Trabajo de Diploma. Facultad de Química Farmacia. UCLV; 2006.
56. Saucedo Hernández Yanelis. "Evaluación fotoquímica y analítica de las hojas del *Parthenium Hysterophorus*, Linn (Escoba Amarga)". Tesis de Maestría. Universidad de la Habana; 1999.
57. Iyarreta Veitía Maité. "Estudio preliminar de la *Portulaca oleracea* L como droga antihelmíntica ". Tesis para optar por el título de Máster en Ciencias en la especialidad de Química – Farmacéutica. Ciudad de la Habana; 1996.
58. Siverio Mota Mayelin y Díaz León Nadiachy. *Influencia del desgrase por prensado en las características físico – químicas del sólido pulverulento y granulado obtenido a partir de semillas de Curbitina Moschata Duch*. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba; 1997.

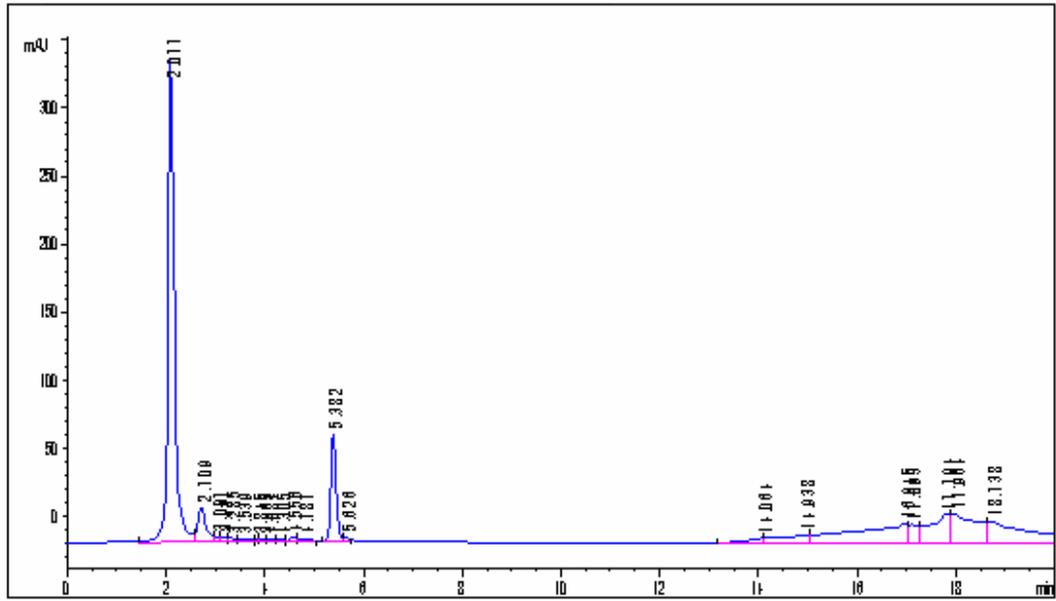
59. Díaz Pérez Lilian M. Diseño y evaluación de comprimidos convencionales de extractos secos (*Plantago Lanceolata*). Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia Universidad de Santiago de Compostela. 1995.



Anexo II.2. Cromatograma del sólido pulverulento obtenido al evaluar la influencia de un ambiente de humedad de 47.2 %.



Anexo II.3. Cromatograma del sólido pulverulento obtenido al evaluar la influencia de un ambiente de humedad de 70.4 %.



Anexo II.4. Cromatograma del sólido pulverulento obtenido al evaluar la influencia de un ambiente de humedad de 97.5 %.

Anexo III. Procesamiento estadístico de la evaluación de humedad.

Polynomial Regression - Concentracion H versus Humedad

Polynomial Regression Analysis

Dependent variable: Concentracion H

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
CONSTANT	1.52625	0.0136393	111.901	0.0000
Humedad	-0.0264662	0.00231963	-11.4097	0.0000
Humedad^2	0.000347316	0.0000625726	5.55061	0.0000
Humedad^3	-0.00000155306	4.08011E-7	-3.80642	0.0006

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	2.88336	3	0.961118	645.80	0.0000
Residual	0.0446475	30	0.00148825		
Total (Corr.)		2.928	33		

R-squared = 98.4752 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 98.3227 percent

Standard Error of Est. = 0.0385778

Mean absolute error = 0.0293824

Durbin-Watson statistic = 2.14316 (P=0.1678)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.137912

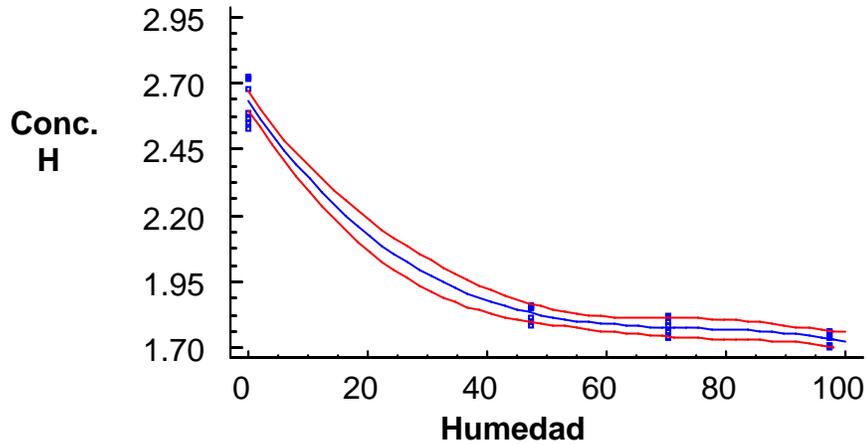
The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a third order polynomial model to describe the relationship between Concentración H and Humedad. The equation of the fitted model is

$$\text{Concentración H} = 1.5263 - 0.0264 * \text{Humedad} + 0.0003 * \text{Humedad}^2 - 0.0000015530 * \text{Humedad}^3$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Concentration H and Humedad at the 99% confidence level.

Plot of Fitted Model



Further ANOVA for Variables in the Order Fitted

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Humedad	2.37943	1	2.37943	1598.81	0.0000
Humedad^2	0.482362	1	0.482362	324.11	0.0000
Humedad^3	0.0215631	1	0.0215631	14.49	0.0006
Model	2.88336	3			

Analysis of Variance with Lack-of-Fit

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	2.88336	3	0.961118	645.80	0.0000
Residual	0.0446475	30	0.00148825		
Lack-of-Fit	0.0	0			
Pure Error	0.0446475	30			

Total (Corr.) 2.928 33

Unusual Residuals

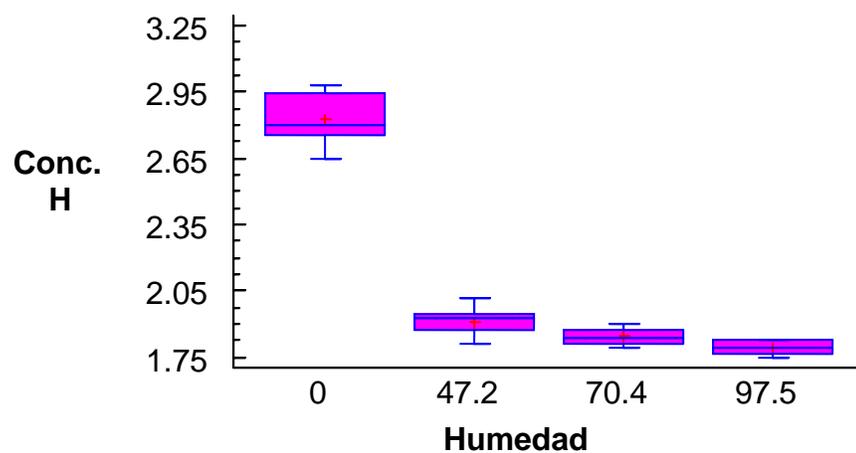
Row	Predicted		Studentized	
	Y	Y	Residual	Residual
1	1.6	1.52625	0.07375	2.17
2	1.6	1.52625	0.07375	2.17
3	1.44	1.52625	-0.08625	-2.61

Multiple-Sample Comparison

Analysis Summary

Dependent variable: Concentracion H
 Factor: Humedad

Number of observations: 36
 Number of levels: 4



ANOVA Table for Concentracion H by Humedad

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.67987	3	0.893291	444.16	0.0000
Within groups	0.0643575	32	0.00201117		
Total (Corr.)	2.74423	35			

Table of Means for Concentracion H by Humedad with Standard error intervals

Humedad	Count	Std. error		Lower limit	Upper limit
		Mean	(pooled s)		
0	8	2.7948	0.0158555	2.78289	2.81461
47.2	10	1.883	0.0141816	1.873818	1.902182
70.4	8	1.8325	0.0158555	1.816645	1.848355
97.5	10	1.7808	0.0141816	1.773818	1.802182
Total	36	0.99138			

Multiple Range Tests for Concentracion H by Humedad

Method: 95.0 percent Bonferroni			
Humedad	Count	Mean	Homogeneous Groups
97.5	10	1.7808	X
70.4	8	1.8325	XX
47.2	10	1.883	X
0	8	2.7948	X

Variance Check

Cochran's C test: 0.698355 P-Value = 0.000389062

Bartlett's test: 1.71393 P-Value = 0.000950359

Hartley's test: 16.1814

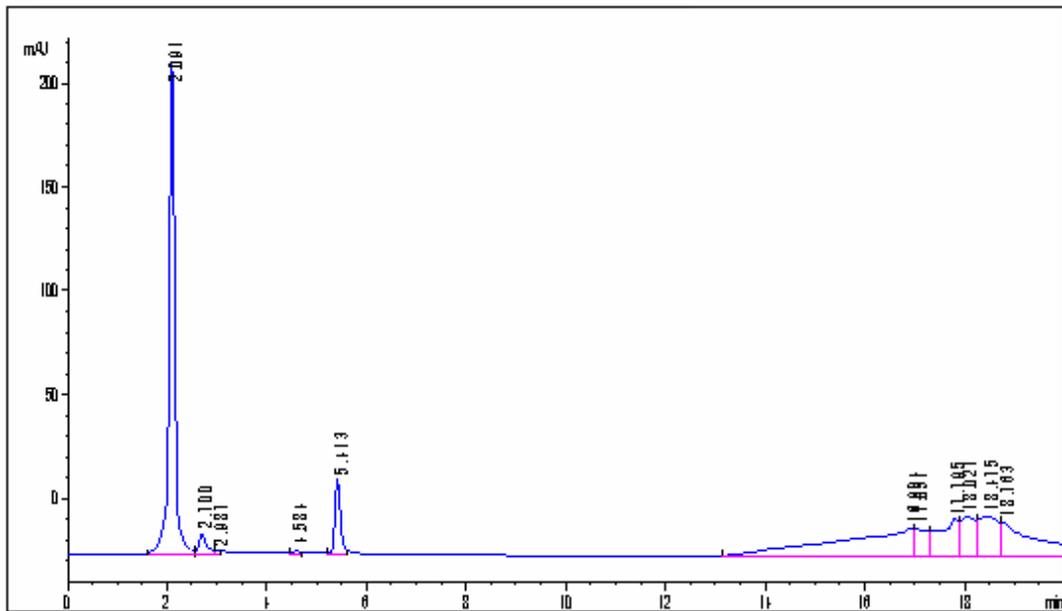
Levene's test: 4.50542 P-Value = 0.00955462

Kruskal-Wallis Test for Concentracion H by Humedad

Humedad	Sample Size	Medias Rangos	Medias Reales
0	8	32.5 a	(2.79)
47.2	10	21.8 b	(1.88)
70.4	8	14.56 bc	(1.83)
97.5	10	7.15 c	(1.78)

Test statistic = 27.9851 P-Value = 0.00000365827

Anexo IV. Cromatogramas del sólido pulverulento para el estudio de influencia de la luz.



Anexo IV.1. Cromatograma del sólido pulverulento obtenido al evaluar la influencia de la luz (frascos transparentes).

Summary Statistics for Conc IL

Ind Luz	Count	Average	Standard deviation	Standard error	Minimum
Frascos A.	8	1.30475	0.0223207	0.00789156	1.20
Frascos I.	8	0.98325	0.00916125	0.00323899	0.97
testigo	8	2.79025	0.0680205	0.0240489	2.74
Total	24	1.69275	0.610259	0.124569	0.97

Ind Luz	Maximum	Coeff. of variation
Frascos A.	1.5	2.72619%
Frascos I	1.08	13.8283%
testigo	2.8	4.45671%
Total	2.8	75.9264%

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	8.5291	2	4.26455	2456.10	0.0000
Within groups	0.0364625	21	0.00173631		
Total (Corr.)	8.56556	23			

Multiple Range Tests for Conc IL by Ind Luz

Method: 95.0 percent Bonferroni

Ind Luz	Count	Mean	Homogeneous Groups
Frascos I.	8	0.98325	X
Frascos A.	8	1.30475	X
testigo	8	2.79025	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Frascos A. - Frascos I.	*0.3215	0.054198
Frascos A. - testigo	*-1.4855	0.054198
Frascos I. - testigo	*-1.807	0.054198

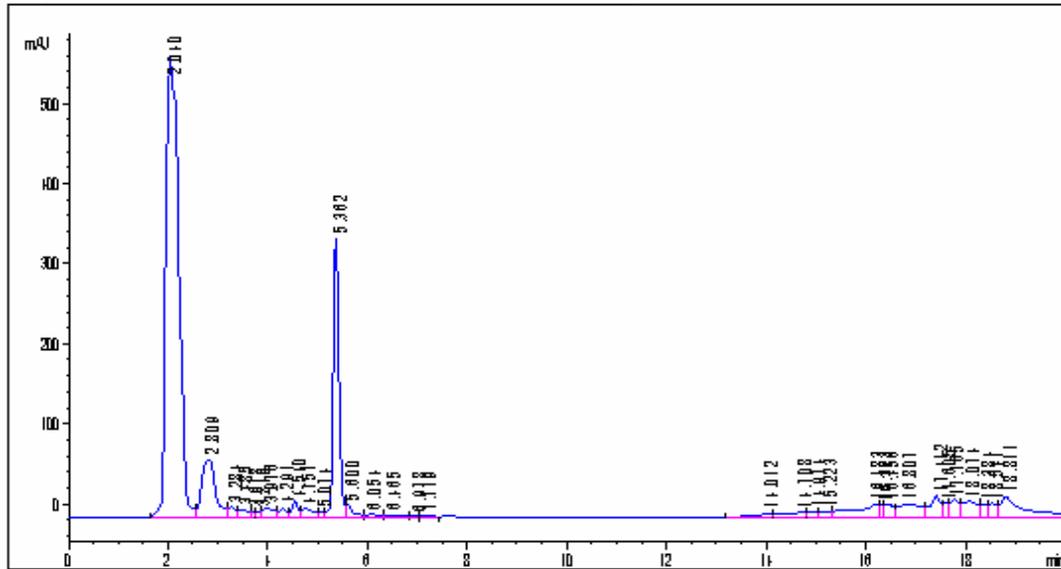
* denotes a statistically significant difference.

Kruskal-Wallis Test for Conc IL by Ind Luz

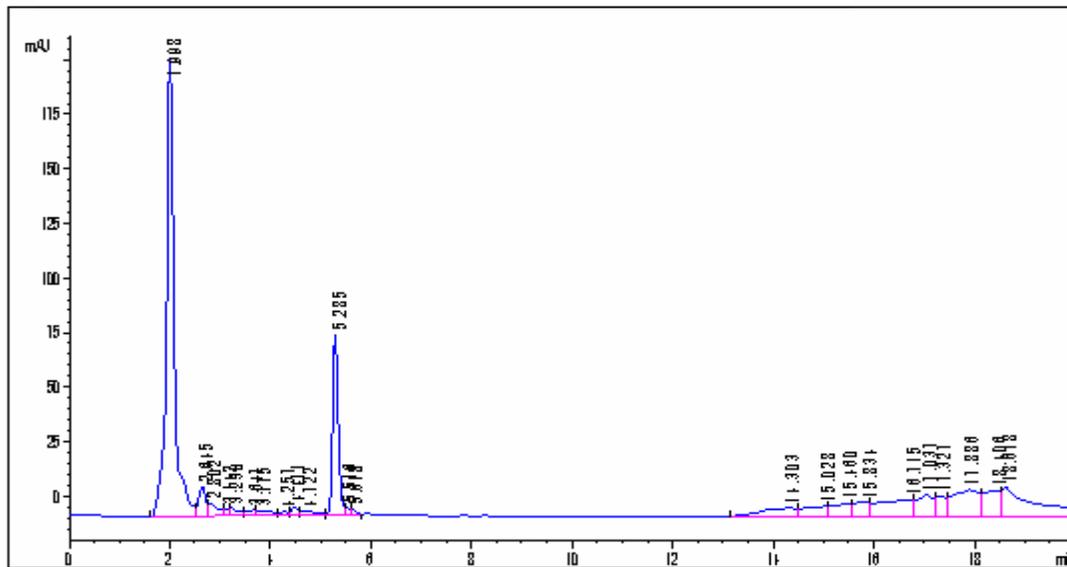
Ind Luz	Sample Size	Average Rank
Frascos A.	8	12.5
Frascos I.	8	4.5
testigo	8	20.5

Test statistic = 20.6325 P-Value = 0.000033091

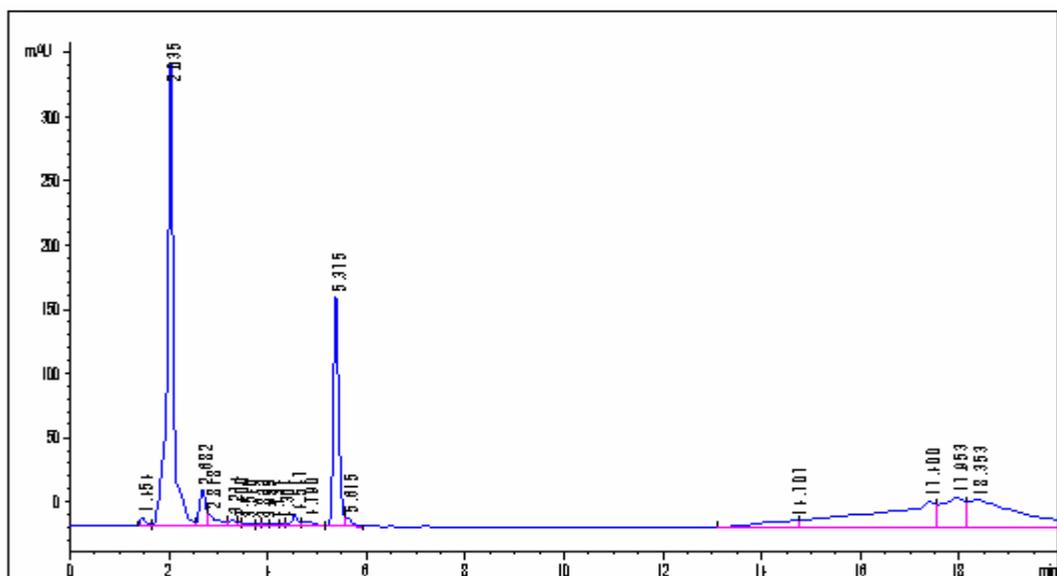
Anexo VI. Cromatogramas del sólido pulverulento para el estudio de estabilidad en fase sólida.



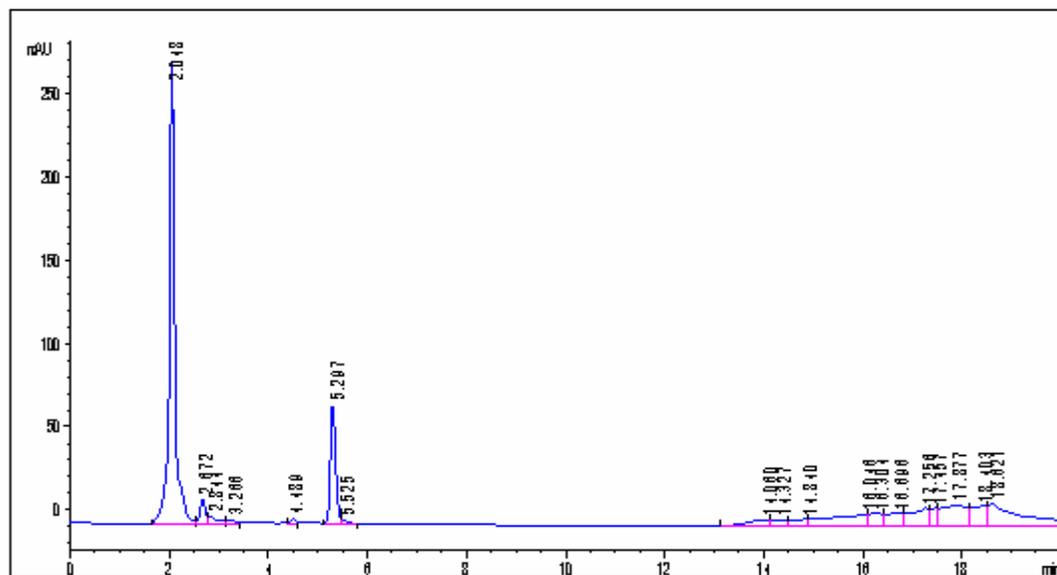
AnexoVI.1. Cromatograma del sólido pulverulento obtenido bajo condiciones 30 °C HR: 60 % a los 15 días.



AnexoVI.2. Cromatograma del sólido pulverulento obtenido bajo condiciones 30 °C HR: 60 % a los 30 días.



AnexoVI.3. Cromatogramas del sólido pulverulento obtenido bajo condiciones 40 °C HR: 75 % a los 15 días.



AnexoVI.4. Cromatograma del sólido pulverulento obtenido bajo condiciones 40 c HR: 75 % a los 30 días.

Anexo VII. Procesamiento estadístico de la evaluación de la estabilidad en fase sólida para el sólido pulverulento.

Multiple-Sample Comparison

Dependent variable: Concentraciones

Factor: Tiempos

Summary Statistics for Concentraciones

Tiempos	Count	Average	Standard deviation	Standard error	Minimum
T 0	8	2.79125	0.0756755	0.0267553	2.78
T1	8	2.34325	0.0616297	0.0217894	2.12
T2	7	2.19414	0.14221	0.0537505	1.96
Total	23	1.32565	0.162588	0.0339019	0.92

Tiempos	Maximum	Coeff. of variation
T 0	2.89	5.14362%
T1	2.4	4.61214%
T2	2.33	12.3969%
Total	2.89	12.2647%

ANOVA Table for Concentraciones by Tiempos

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.393547	2	.196774	20.93	0.0000
Within groups	0.188018	20	.00940089		
Total (Corr.)	0.581565	22			

Table of Means for Concentraciones by Tiempos with Standard error intervals.

Tiempos	Count	Std. error		Lower limit	Upper limit
		Mean	(pooled s)		
T 0	8	2.79125	0.0342799	2.75697	2.82553
T1	8	2.34325	0.0342799	2.31197	2.38053
T2	7	2.19414	0.0366468	1.89105	2.23379
Total	23	2.44263			

Multiple Range Tests for Concentraciones by Tiempos

Method: 95.0 percent Bonferroni

Tiempos	Count	Mean	Homogeneous Groups
T2	7	2.19414	X
T1	8	2.34325	X
T0	8	2.79125	X

Variance Check

Cochran's C test: 0.679819 P-Value = 0.0357231

Bartlett's test: 1.29804 P-Value = 0.086759

Levene's test: 1.01991 P-Value = 0.378633

Multiple-Sample Comparison

Analysis Summary

Dependent variable: Concentraciones

Factor: Tiempos

Number of observations: 24

Number of levels: 3

Summary Statistics for Concentraciones

Tiempos	Count	Average	Standard deviation	Standard error	Minimum
T 0	8	2.79125	0.0756755	0.0267553	2.7
T1	8	2.16475	0.0461171	0.0163049	2.11
T2	8	2.02395	0.00534522	0.00188982	2.02
Total	24	2.32665	0.217649	0.0444274	2.02

Tiempos	Maximum	Coeff. of variation
T 0	2.67	5.14362%
T1	2.24	4.27505%
T2	2.025	0.537209%
Total	2.67	18.4188%

ANOVA Table for Concentraciones by Tiempos

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.03436	2	0.517179	196.84	0.0000
Within groups	0.055175	21	0.00262738		
Total (Corr.)	1.08953	23			

Table of Means for Concentraciones by Tiempos with Standard error intervals

Tiempos	Count	Std. error			
		Mean	(pooled s)	Lower limit	Upper limit
T0	8	2.79125	0.0181224	2.75313	2.80937
T1	8	2.16475	0.0181224	2.13063	2.18687
T2	8	2.02395	0.0181224	1.99687	2.04312
Total	24	2.32665			

Multiple Range Tests for Concentraciones by Tiempos

Method: 95.0 percent Bonferroni

Tiempos	Count	Mean	Homogeneous Groups
---------	-------	------	--------------------

T2	8	2.02395	X
T1	8	2.16475	X
T0	8	2.79125	X

Variance Check

Cochran's C test: 0.726552 P-Value = 0.0117475

Levene's test: 5.31078 P-Value = 0.0135981