



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE QUIMICA-FARMACIA
Departamento De Farmacia

Trabajo de Diploma

*Estabilidad química preliminar del sólido pulverulento
de Parthenium hysterophorus, Linn, en base a partenina.*



Autor: Bassam Mohamad Safa

Tutores: Msc. Yanelis Saucedo Hdez.

Dra. Mirtha Mayra Glez Bedia.

Msc. Miguel Ángel Alba de Armas.

Asesores: Dr. Luís Bravo Sánchez

Tec. Adalberto Quintana Fdez

Santa Clara

2007





Hago constar que el presente trabajo de diploma fue realizado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas como parte de la culminación de estudios de la especialidad de licenciatura en ciencias farmacéuticas autorizando a que el mismo sea utilizado por la Institución, para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos, ni publicados sin autorización de la Universidad.

Firma del Autor.

Los abajo firmantes certificamos que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdo de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple con los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura referido a la temática señalada.

Firmas de los Tutores.

Firma del Jefe de Dpto.

Donde se defiende el
trabajo.

Firma del Responsable de
Información Científico-Técnica



Pensamiento.

*En el corazón de todos los inviernos vive una primavera palpitante,
y detrás de cada noche, viene una aurora sonriente.*

Gibran Khalil Gibran.



Dedicatoria

- *A la memoria de mi tío Abaas Atoui, que eternamente en la paz de Dios descanse y que el Dios le brinde su paraíso.*



Agradecimientos.

Con este trabajo culmina una etapa importante de mi vida, el momento insta a la reflexión y en mi memoria se dibujan las imágenes de todos aquellos que contribuyeron de una forma u otra en mi educación y me ayudaron a alcanzar una meta como esta.

Así que doy gracias:

✚ *A Dios, primero que todo, por ser mi razón de ser.*

✚ *A mis padres, quienes con el alma de un gigante y el corazón como el de un niño, me han enseñado siempre lo correcto para llegar a ser la persona que soy hoy y a quienes junto a mi, dan gracias por vivir la aspiración de este sueño que les deseo lo mejor del mundo y que los quiero mucho también.*

✚ *A mí maravillosos hermanos, Mariam, Samaa, Rabab, Hassan y Kassem, por estar siempre apoyándome durante todos los años que he estado lejos del país para que yo pudiera ser profesional, a ellos les deseo lo mejor del mundo y los quiero mucho.*



- + A mis tutores, Yanelis, Mirta Mayra, Miguel Ángel, por ayudarme y guiarme siempre hacia lo correcto hasta lograr el objetivo de ser lo que soy hoy.*
- + A, Luís bravo, Adalberto, por sus ayudas a realizar este trabajo.*
- + A mis verdaderos amigos, No quisiera mencionar sus nombres, pues cometería el grave error de olvidar a alguno y eso sería imperdonable.*
- + A todos mis profesores, por enseñarme y transmitirme sus conocimientos.*
- + Al pueblo de CUBA y a su Revolución, por darme la oportunidad para hacer mi sueño realidad.*



Resumen.

En el presente trabajo se realizó una caracterización de la distribución del tamaño de partícula del sólido pulverulento del *Parthenium hysterophorus*, Linn., (escoba amarga) mediante análisis granulométrico, que mostró una mejoría en su distribución gaussiana normal, con relación a trabajos precedentes. Además, se desarrolló un seguimiento cromatográfico en capa delgada a muestras sometidas a condiciones estrés lo cual permitió identificar cualitativamente posibles productos de degradación en el material vegetal analizado. Por otra parte, se demostró que el método analítico mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) (12) para la cuantificación de partenina en el sólido pulverulento del *Parthenium hysterophorus*, Linn, es específica bajo las condiciones de trabajo establecidas y puede emplearse en los estudios de estabilidad.

Se demostró que la humedad es un factor que influye negativamente en la estabilidad química de la partenina, presente en el sólido pulverulento, al someter muestras a la condición de estrés 25°C /80 % HR.

La estabilidad química del sólido pulverulento, en base a partenina, conservado en frascos de vidrio ámbar cubiertos con papel de aluminio y tapón de goma, evaluada según las normativas IHC (2003) es insuficiente con vistas a su comercialización como materia prima para la elaboración de formas de dosificación.



Índice

	Pág.
Introducción.	1
Capítulo I. Revisión Bibliográfica.	3
I.1- Generalidades de la planta.	3
I.1.1- Nombres.	3
I.1.2- Familia botánica.	3
I.1.3- Descripción.	3
I.1.4- Distribución.	3
I.1.5- Fenología.	3
I.1.6- Partes empleadas.	3
I.1.7- Composición química de la planta.	3
I.1.8- Uso de la planta en la medicina tradicional.	4
I.2- Lactonas sesquiterpénicas: Generalidades, actividades biológicas de interés.	5
I.3- Propiedades químicas y físicas de la partenina Ingrediente activo principal.	5
I.4- Técnicas analíticas empleadas en la determinación de sesquiterpenicos.	6
I.4.1- Separación y análisis cromatográfico de sesquiterpenlactonas por cromatografía en capa fina.	6
I.4.2- Aplicación de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para el análisis de lactonas sesquiterpénicas.	7
I.4.3- Especificidad de técnicas de análisis cuantitativo.	8
I.5- Estabilidad.	11
I.5.1- Tipos de inestabilidad.	12
I.5.2- Estabilidad de fármacos en estado sólido.	12



	Pág.
I.5.3- Factores que influyen en la estabilidad.	13
I.5.3.1-Influencia de la humedad.	13
I.5.3.2- Influencia de la luz.	14
I.5.3.3- Influencia de la temperatura.	15
I.5.4- Estudios de estabilidad.	15
I.5.4.1- Estudios de estabilidad en condiciones naturales de almacenamiento.	16
I.5.4.2- Estudios acelerados de estabilidad.	16
I.5.4.3- Estudios de estantería.	17
I.5.4.4- ensayos de estrés.	17
I.5.4.5- Condiciones de los estudios de estabilidad.	18
I.5.5- Parámetros a evaluar.	19
I.6- Período de Validez.	20
I.7- Período de Validez Comprobado.	20
I.8- Período de Validez Tentativo.	20
 Capítulo II. Materiales y Métodos	21
II.1 - Recolección, secado y molinado del material vegetal.	21
II.2 - Análisis granulométrico.	21
II.3 - Especificidad de la técnica analítica mediante Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC).	22
II.3.1- Preparación de las muestras de ensayo.	23
II.3.2- Perfiles de HPLC.	24
II.3.3- Expresión de los resultados.	25
II.4 - Cromatografía en capa delgada cualitativa (CCD).	26
II.5 - Caracterización cualitativa de los posibles productos de degradación mediante espectrofotometría ultravioleta.	27



	Pág.
II.6 - Estudio de estabilidad.	28
II.6.1- procedimiento experimental.	28
Capítulo III. Análisis y Discusión de los Resultados.	30
III.1- Análisis granulométrico.	30
III.2- Especificidad de la técnica analítica mediante Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC).	31
III.3- Cromatografía en capa delgada cualitativa (CCD).	40
III.4- Comportamiento en el UV de los posibles productos de degradación.	41
III.5- Estudio de estabilidad.	44
III.5.1 Condición estrés.	44
III .5.2 Estabilidad acelerada y de vida estante.	46
Conclusiones	48
Recomendaciones	49
Bibliografía	50
Anexos	55



Introducción

Desde tiempos inmemorables, las plantas medicinales constituyeron el principal arsenal terapéutico del hombre. El *Parthenium hysterophorus*, Linn conocida comúnmente como escoba amarga, es reconocida en la medicina tradicional por su aplicación como antipirética, en el tratamiento de afecciones de la piel y como antiparasitaria. Se destacan variados reportes sobre su empleo como amebicida efectivo de potencia comparable al Metronidazol.

En el Departamento de Farmacia de la UCLV se desarrollan investigaciones analíticas y tecnológicas con el polvo de la planta, encaminadas a la obtención de una forma farmacéutica de utilidad antiparasitaria científicamente fundamentada, acorde a las exigencias de normativas establecidas por el Centro Estatal de Control de Calidad de los Medicamentos (CECMED) y en Farmacopeas internacionales, que garanticen de esta forma los requisitos de calidad, seguridad y eficacia exigidos al efecto.

La investigación desarrollada da continuidad a los estudios tecnológicos y analíticos realizados en trabajos precedentes al evaluar la estabilidad químico- física del sólido pulverulento (Hernández, M, 2006).

Objetivos:

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

- ✚ Demostrar la especificidad de la técnica analítica HPLC para la cuantificación de partenina en el sólido pulverulento *Parthenium hysterophorus*, Linn (escoba amarga) para su aplicación en estudios de estabilidad.
- ✚ Conocer la influencia de la humedad en la estabilidad de los sólidos pulverulentos obtenidos a partir de *Parthenium hysterophorus*, L (humedad y temperatura)



- ✚ Determinar la estabilidad química del sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn, en base a partenina, en condiciones de almacenamiento aceleradas y de vida estante.



Capítulo I. Revisión Bibliográfica.

I.1 Generalidades de la planta:

I.1.1 Nombres:

Científico: *Parthenium hysterophorus*, Linn.

Vulgares: artemisilla, confítillo (Cuba); ajenjo cimarrón, artemisa, santa maría, hierba amarga (Puerto Rico); feverfew, mugwort (Estados Unidos y Antillas Inglesas), botonera (Venezuela) (1) (2) (3).

I.1.2 Familia botánica: Asteraceae (4).

I 1.3 Descripción: Hierba pubescente, comúnmente muy ramificada, de hasta 80 cm de altura. Hojas aovadas u oblongas, 1 ó 2 pinatífidas, de hasta 10 cm. de largo y 5 cm. de ancho. Capítulos florales dispuestos en panojas de hasta 10 cm. de diámetro lígulas suborbiculares, blancas, de hasta 1 mm de largo. Aquenio de 2 x 1,2 mm, negro y con 2 aristas delgadas (1) (3) (5).

I.1.4 Distribución: Es una de la hierba más común y abundante de toda la isla, particularmente en los terrenos colorados, donde forma extensos macizos en los caminos y en terrenos yermos y cultivados, crece esta especie además en las antillas mayores y en algunas de las menores, las Bermudas, el sur de los Estados Unidos y en la América tropical continental (1) (2) (5).

I.1.5 Fenología: Hierba anual que puede encontrarse durante todo el año, pero con mayor frecuencia en otoño e invierno (4).

I.1.6 Partes empleadas: las raíces, las flores y toda la planta. (1) (5).

I.1.7 Composición química de la planta.

Saponinas, aminoácidos y polisacáridos (6) lactonas sesquiterpénicas como la partenina hysterina, coronofilina, caryofilina. lactonas monoterpénicas como limoneno y pineno, esteroides como campesterol, estigmasterol, beta-sitosterol, derivados de flavonoide: quercetina, quercetagetina, kaempferol, saponinas, aminoácidos, taninos y quinonas (7) (8)



(9). Además contiene otros elementos como alcaloides, carbohidratos, alcanos, lípidos, aceites esenciales y compuestos inorgánicos como son: Ca, Fe, Mn, Cu, Zn, K, Na, Mg, Cd y Pb (10) (11). Según un estudio preliminar de un extracto acuoso del *Parthenium hysterophorus*, Linn el principio activo mas abundante es la partenina, una lactona sesquiterpénica a la que se le atribuye efecto antitumoral y útil en tratamiento de neuralgias. (6).

I.1.8. Uso de la planta en la medicina tradicional.

Se usa como remedio casero contra la fiebre y en baños para los granos (1) (4). Los vecinos de la península de zapata y de la ciénaga se inmunizan contra el paludismo con el cocimiento de la raíz de la escoba amarga, para enfermedad del pecho. Según Gomez de la maza, presenta buenos resultados contra las neuralgias craneales (1) (4). Se considera además como hipostenizante gástrico, un tónico y estimulante estomacal. Agrega Gómes de la maza en su Flora Habanera que esta planta es amarga, febrífugo, y su zumo útil tópicamente contra la ulcera tuberculosas y sifilíticas que constituyen el pían su principio activo es la partenina que se ha usado como febrífugo pero parece más eficaz en las neuralgias craneales (1) (4). Ha sido empleado en cocimientos para el corazón, pero en estudios para la evaluación farmacológica de diferentes plantas, incluyendo la escoba amarga, se demostró aplicando a cobayos un extracto a una concentración de 20 g en 100 mL de agua, la ausencia de efectos sobre este órgano. (12). Otras propiedades atribuidas son las siguientes: febrífuga (incluyendo fiebre tifoidea), corroborante, vermífuga, hipoglicemiante, antiartrítica, hipotensora, antiemética, antiespasmódica y se utiliza en los casos de afecciones de la piel, disfonías y sinusitis. (4). En México se utilizan las flores y hojas en una extracción con agua caliente administrada por vía oral, en mujeres adultas como emenagoga. (1). En la India se utiliza la planta entera seca realizando una extracción con agua caliente como disentérica, tónica febrífuga, contra neuralgias y para estimular la función menstrual. (9). En Haití se hace una extracción con agua de las hojas secas y se aplican externamente en adultos para afecciones cutáneas (9).



En Puerto Rico las hojas y los tallos en extracción con agua caliente, se administra por vía oral en adultos para combatir la fiebre (9).

I.2. Lactonas sesquiterpénicas: Generalidades, actividades biológicas de interés.

Las lactonas sesquiterpénicas se encuentran generalmente en las flores y partes aéreas de la planta, son sustancias amargas y casi todas presentan propiedades citotóxicas (9). Son una clase importante de sustancias que causan dermatitis alérgica en contacto con el ser humano. La presencia de un grupo metileno exocíclico respecto a la lactona, parece ser el principal requisito para la actividad inmunoquímica (13). A las sesquiterpenlactonas se han asociado actividades biológicas tales como: acción citotóxica, antiinflamatoria, antitumoral, antibacterial, antidermatitis en humanos, venenosa, insecticida, antimicótico, inhibidores del crecimiento de las plantas (14). La actividad de las sesquiterpenlactonas ha sido relacionada con el anillo lactónico provisto del grupo exometileno. Por otro lado, la presencia de un grupo carbonilo α , β -insaturado ha sido asociada con la acción citoprotectora de algunas sesquiterpenlactonas (14). Se ha estudiado la actividad antitumoral de sesquiterpenlactonas, relacionadas a la helenalina, la actividad antimicrobiana también ha sido evaluada (9). Un hecho interesante es que la artemisinina, una sesquiterpenlactona aislada de varias plantas del género *Artemisia* compuestas, es 50 veces más activa contra el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*, que la cloroquina, y parece ser que su acción se relaciona con la presencia de una funcionalidad peróxido.

I.3. Propiedades químicas y físicas de la partenina, ingrediente activo principal.

Fórmula global: $C_{15}H_{18}O_4$.

Peso Molecular: 262.305.

Composición: C 68.69%; H 6.92%; O 24.40%.

Punto de Fusión: 163-166°C.

Rotación Óptica: $[\alpha]^{25D} + 7.02$ (c, 2.71 en $CHCl_3$).



Solubilidad: Sol. MeOH, CHCl₃; poco sol. H₂O.

UV: [neutral] $\lambda_{\text{máx}}$ 215 (ϵ 13100); 340 (ϵ 20) (MeOH).

Otros datos: Farmacología: Isómero activo.

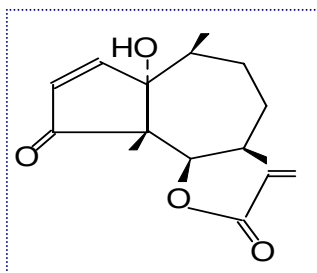
Importancia/Uso biológico:

Bloqueador adrenérgico. Agente antineoplásico, depresor SNC. Posee actividad antimalárica y antiauxina.

Fuente Biológica: Principio amargo de *Parthenium hysterophorus* e *Iva nevadensis*.

Reacciones adversas y Toxicidad: Su contacto puede causar dermatitis. LD₅₀ (rat, ipr) 42 mg/kg (15) (16).

Estructura química: (17)



Es soluble en cloroformo, etanol, metanol, acetona, y ácido acético e insoluble en hexano, heptano, benceno, tolueno, xileno y amoníaco (18).

I.4 Técnicas analíticas empleadas en la determinación de sesquiterpenoides.

Una técnica de análisis a ser empleada, en un estudio de estabilidad, debe basarse en las características estructurales, y propiedades químicas o biológicas de cada principio activo de un producto farmacéutico, que permite distinguir cada principio activo de sus productos de degradación, de tal forma que puede ser medido en forma selectiva y precisa (19).

I.4.1. Separación y análisis cromatográfico de sesquiterpenlactonas mediante cromatografía en capa fina.

Las sesquiterpenlactonas pueden separarse y analizarse bien sea por cromatografía en columna o cromatografía en capa fina, utilizando sílica gel y eluentes como: cloroformo:



metanol (19:1), cloroformo: metanol (19:1), cloroformo: eter etílico (4:1), cloroformo: eter etílico (5:1), benceno: acetona (4:1), benceno: acetato de etilo (5:5), etc. (14). Como agentes visualizadores (reveladores) para los análisis por Cromatografía en capa fina pueden utilizarse: ácido sulfúrico concentrado y calentamiento, vapores de yodo, Luz Ultravioleta 254 nm, o permanganato de potasio al 1%. También se han reportado otros reveladores para las sesquiterpenlactonas (14).

Según Domínguez, X. Alejandro la partenina puede ser aislada a partir de un extracto etanólico realizando una extracción previa con éter de petróleo, la fracción etanólica se evapora y el residuo es extraído con cloroformo, esta solución en cromatografía de capa fina (CCF) muestra cinco manchas $R_f = 0.85$ (verde); $R_f = 0.78$ (verde brillante); $R_f = 0.55$ (carmelita); $R_f = 0.45$ (azul); $R_f = 0.18$ (amarillo), usando como solvente cloroformo-acetona (9:1) y ácido sulfúrico como agente cromogénico (12).

I.4.2 Aplicación de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para el análisis de lactonas sesquiterpénicas.

Actualmente, se pueden separar y analizar mezclas de sesquiterpenlactonas en poco tiempo, por cromatografía líquida de alta eficiencia.

La Fig. 1 muestra el cromatograma HPLC del extracto crudo de sesquiterpenlactonas del *Parthenium schottii, compositae* (14). 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 estudiada, el tiempo de retención, y los factores de capacidad de 33 compuestos de pseudoguayanólidos y xantanólidos presentes en el *Parthenium schottii* 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 utilizó un detector UV de 215 nm. (22). La elución fue desarrollada, usando acetonitrilo y agua el siguiente gradiente, 10-25 % (gradiente lineal); 24-27 min., 25-40 % (gradiente lineal); y 40 % mantenido después de 27 min.

La razón de flujo fue de 1 mL / min., para las columnas preparativas (20). Los estándares fueron disueltos en metanol y aplicados en la columna 100 g de muestra del material seco, fueron extraídos en 500 mL de cloroformo, usando una máquina sacudidora por 5 min. El filtrado fue evaporado, y disuelto en 100 mL de metanol. La partenina bajo estas condiciones presenta un tiempo de retención de 18.8 y un factor de capacidad de 8.53 (20).

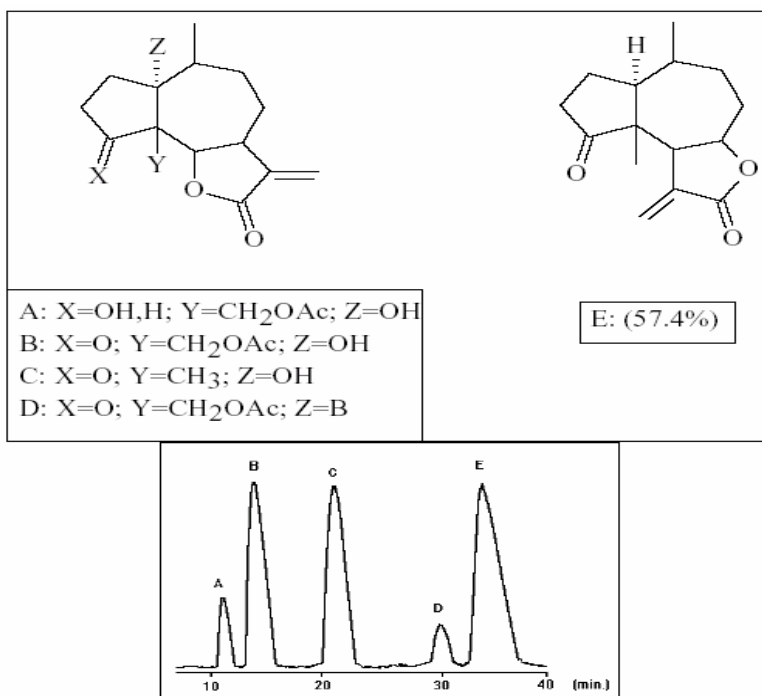


Fig.1. Cromatograma HPLC del extracto crudo de sesquiterpenlactonas del *Parthenium schottii*, *compositae* (columna ODS, eluente acetonitrilo-agua, detección 215 nm).

I.4.3. Especificidad de técnicas de análisis cuantitativo.

Se entiende como especificidad, la capacidad de un método de determinar inequívocamente un analito o parámetro en presencia de los otros componentes de la muestra (matriz) sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que pueden estar presentes (21). La especificidad de un método analítico se determina comparando los resultados del análisis de muestras que contienen impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con el



resultado del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias (22) (23). Según la bibliografía revisada varios estudios realizados, plantean que con el objetivo de evaluar la especificidad, del método analítico se analizó una muestra de referencia, y una muestra sometida a condiciones drásticas tales como: hidrólisis ácida (HCL), hidrólisis básica (NaOH), oxidación (H₂O₂), bajo la luz solar, y ultravioleta. (24) (25) (26) (27). Según la guía de validación, la especificidad puede verificarse de diferentes maneras, dependiendo del tipo de análisis a realizar. Es importante tomar en cuenta, que en aquellos casos en que la matriz de la muestra es variable, tanto en términos de su composición (productos biológicos o de origen natural), así como en la fuente de las materias primas que las componen (diferentes proveedores, diferentes orígenes), se recomienda que la especificidad se establezca para las diferentes composiciones o fuentes en forma independiente:

1) Análisis Tipo I: Potencia, disolución y uniformidad de contenido. Se puede demostrar de diferentes maneras:

a) Comparación del comportamiento de la matriz o impurezas con respecto al comportamiento del estándar:

Se prepara una solución estándar del analito, a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de matriz a la misma concentración relativa. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones. La matriz no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.

b) Comparación del comportamiento de muestra con respecto al comportamiento del estándar.

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada, en el procedimiento de ensayo y una solución de muestra a la misma concentración. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones: La muestra no debe presentar ningún tipo de señal que interfiere con la señal del estándar.



.c) Comparación del comportamiento de muestra enriquecida con matriz con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con matriz.

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de muestra a la misma concentración. Ambas soluciones son enriquecidas con una cantidad equivalente de matriz. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones enriquecidas. El criterio de aceptación es que el comportamiento de las muestras enriquecidas y del patrón enriquecido, debe ser lo más cercano posible, en aquel punto en que se lleva a cabo la medición del analito. Lo cual es indicativo de que la matriz, no aporta ningún tipo de señal que interfiera con la medición.

d) Procedimientos adicionales para verificar la especificidad.

- Ensayo de la pureza de pico, cuando se cuenta con un detector de arreglo de diodos o con espectrometría de masas.
- Reanálisis del pico, cuando el analito de interés es recogido y reanalizado bajo diferentes condiciones cromatográficas o con métodos sensitivos a la estructura del analito.
- Comparación de resultados obtenidos, cuando la muestra puede ser analizada por dos o más métodos de separación o de detección.

2) Análisis Tipo II: Pruebas cuantitativas para la determinación, del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas.

a) Adición estándar de impurezas a la muestra.

Este método se utiliza, si se encuentran disponibles en el mercado los patrones correspondientes a las impurezas. Se agrega a la muestra, diferentes concentraciones de impurezas, a la concentración normal de trabajo. Se debe demostrar que el contenido de impurezas determinado en el ensayo tiene una exactitud y precisión apropiadas para el método al límite de cuantificación.

b) Comparación de métodos. En los casos en que los patrones de impurezas no están disponibles, la especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del



ensayo con el método propuesto, con resultados obtenidos por un segundo método bien caracterizado u oficial. La comparación debe incluir muestras almacenadas bajo condiciones extremas relevantes (luz, calor, humedad, hidrólisis ácida o básica, oxidación). Estas condiciones deben ser escogidas de acuerdo a la estructura química del analito, que determinará la susceptibilidad del mismo a la descomposición. En el caso de la determinación cuantitativa de impurezas, se deben comparar los resultados obtenidos por ambos métodos en el caso de pruebas de impurezas cromatográficas, se deben comparar los perfiles de impurezas.

3) Análisis tipo IV: Pruebas de identificación:

Deben prepararse:

1. Muestras que contengan el analito a identificar.
2. Muestras que no contengan el analito (matriz).
3. Muestras sin analito pero contaminadas con una sustancia de estructura similar.
4. Solución de patrón de la sustancia a identificar, preparado a una concentración equivalente a las anteriores.

Las tres primeras soluciones se comparan con la cuarta solución.

I.5. Estabilidad.

La estabilidad es objeto actualmente de una particular atención, cuando se desarrolla una forma de dosificación, es necesario llevar a cabo una evaluación en profundidad de sus características de estabilidad, para asegurar de que no plantea problemas al respecto o en caso de que así sea, poder acudir a recursos tecnológicos capaces de dotarla de un periodo de validez suficientemente útil terapéuticamente (28). La estabilidad es el grado en que un producto retiene las mismas propiedades, y características, que poseía al momento de su fabricación, dentro de condiciones estándares especificados, y a lo largo de su periodo de almacenamiento y uso (29). La estabilidad de un producto farmacéutico, puede definirse como la capacidad de una formulación particular, en un sistema de envase-cierre específico para mantenerse dentro de sus especificaciones.



La estabilidad de una droga también, puede definirse como el tiempo desde la fecha de fabricación y envasado de la fórmula, hasta que su actividad “química o biológica” no es menor que un nivel predeterminado de potencia rotulada, y sus características “físicas” no han cambiado en forma apreciable (30).

I.5.1 Tipos de inestabilidad.

- + **Inestabilidad física:** Que afecta a las características físicas de los medicamentos.
- + **Inestabilidad química:** Donde a través de una reacción química, del tipo que sea se degrada la parte activa, de una sustancia medicamentosa (oxidación, reducción, hidrólisis, racemización, decarboxilación) 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, las reacciones de hidrólisis y oxidación las que afectan a un mayor numero de principio activos, entre las sustancias susceptibles de hidrolizarse: esterases, amidas, fenoles, lactonas, la oxidación afecta a moléculas con grupos fenoles, olefinas, endioses (31) (32). Los productos formados como consecuencia de la degradación de fármacos aunque en general carecen de actividades farmacológicas pueden ser potencialmente tóxicos o dar lugar a alteración en las características organolépticas (31).
- + **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 (31).
- + **Inestabilidad biofarmaceutica:** Hace referencia a las modificaciones, en la biodisponibilidad del principio activo, provocando perdida en la eficacia, efectos tóxicos (28).

I.5.2 Estabilidad de fármacos en estado sólido: La descomposición de los fármacos en estado sólido ha sido estudiada ampliamente en los últimos años. Su interés se centra fundamentalmente en dos aspectos:



- Las alteraciones de carácter químicos, que puede sufrir el principio activo integrado en la forma farmacéutica (28).
- Los cambios de naturaleza física, es decir la modificación de los parámetros galénicos, (*estabilidad física*) que pueden originar cambios, en la biodisponibilidad del principio activo (*estabilidad biofarmaceutica*) (28).

I.5.3 Factores que influyen en la estabilidad.

Los factores más importantes que pueden influir en el grado, y velocidad de deterioro de los productos farmacéuticos son:

- + Factores ambientales tales como temperatura, humedad, luz, oxígeno y otros como vibración o congelamiento (31) (33).
- + Factores relativos al producto, que pueden incluir:
 - Propiedades físicas y químicas del principio activo, y de los excipientes, como la presencia de ciertas impurezas, la forma cristalina o polimórfica particular, el tamaño de partículas y la posible presencia de agua u otros solventes.
 - La forma farmacéutica y su composición.
 - El proceso de manufactura, incluyendo las condiciones ambientales, los procedimientos tecnológicos y otros como personal, equipos, etc.
 - La naturaleza del envase con el cual, el producto farmacéutico tiene contacto directo.

En este sentido, todos estos factores deben considerarse cuando se determina la vida útil de un producto (33).

I.5.3.1 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 (35).

I.5.3.2 Influencia de la luz.

La luz, es un factor influyente en la degradación de un medicamento al promover reacciones químicas. La mayoría son reacciones de hidrólisis, y de oxidación. Esto como consecuencia de la naturaleza de los grupos funcionales, en la estructura de un medicamento y también como resultado de la acción del agua y el oxígeno (29).

La oxidación de los medicamentos, ocurre de manera secuencial (iniciación, propagación y terminación). Las moléculas son susceptibles de oxidación espontánea o auto oxidación, también son capaces de readaptarse a la absorción de la radiación de la luz del sol, la luz artificial, particularmente visible y la luz ultravioleta, fenómeno denominado fotólisis (29). La reacción fotoquímica, es una fuente de degradación muy importante, no solo en el tiempo de almacenaje, sino también en el proceso de elaboración (10). 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 (9). Dentro de las reacciones más comunes en fotoquímica, tenemos la apertura de anillos pequeños, la pérdida de halógeno en compuestos polihalogenados, reordenamientos e isomerizaciones.(9) 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). La fotólisis puede ser prevenida mediante un determinado acondicionamiento del producto en vidrio de color ámbar, blister de aluminio (31).

I.5.3.3 Influencia de la temperatura.

La temperatura actúa como un potente catalizador de reacciones químicas, la frecuencia de reacciones es proporcional al número de colisiones por unidad de tiempo. El número de colisiones incrementa a medida que aumenta la temperatura (29).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).

I.5.4 Estudios de estabilidad.

Pruebas que se efectúan para obtener información, sobre las condiciones en las que se deben procesar, y almacenar las materias primas o los productos semielaborados, o terminados, según sea el caso. Las pruebas de estabilidad también se emplean, para determinar la vida útil del medicamento, en su envase original y en condiciones de



almacenamiento especificadas (36). El objetivo de los estudios de estabilidad, es proveer evidencia documentada de cómo las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas del medicamento, varían con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales tales como: temperatura, humedad y luz, y establecer las condiciones de almacenamiento adecuadas y el periodo de caducidad (37).

I.5.4.1 Estudios de estabilidad en condiciones naturales de almacenamiento.

Pruebas que se efectúan para obtener información sobre las condiciones en las que se deben procesar y almacenar las materias primas o los productos semielaborados o terminados, según sea el caso. Las pruebas de estabilidad también, se emplean para determinar la vida útil del medicamento en su envase original, y en condiciones de almacenamiento especificadas. Son los estudios diseñados para determinar, a largo plazo, las características físicas, químicas y en los casos en que se requiera, microbiológicas y de actividad biológica de la formulación, envasada en empaque primario definitivo, bajo condiciones que sean como mínimo $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $65\% \pm 5\%$ de humedad relativa(38). El propósito de tales estudios es la fijación, comprobación y/o extensión del período de validez de un producto. Las condiciones de humedad relativa, sin embargo, pueden adaptarse a requerimientos especiales de simulación o de prueba del efecto de la permeabilidad del empaque primario, siendo necesario justificar esta modificación. Lo mismo debe aplicarse a condiciones de simulación a largo plazo a temperaturas constantes superiores a 30°C , en cuyo caso, el período de vida útil obtenido no permite extrapolaciones a las condiciones definidas como naturales, pero es válido determinar un período de validez a una temperatura constante superior y aplicar el mismo período de vida útil a la temperatura de 30°C (38).

I.5.4.2 Estudios acelerados de estabilidad.

Estudios diseñados con el fin de aumentar la tasa de degradación química o física de un medicamento, empleando condiciones extremas de almacenamiento (36).

Los estudios acelerados aportan información sobre:

- El período de validez.



- La estabilidad del producto, lo que resulta de importancia para su desarrollo (tal como la evaluación preliminar de cambios en la producción, la formulación y el escalado).
- Validación de los métodos analíticos para el programa de estabilidad.
- Perfil de degradación de la sustancia y/o el producto (39).

.El diseño de estos estudios puede incluir temperaturas elevadas, altas humedades y exposición a la luz intensa. Estos estudios tienen como objeto determinar los parámetros cinéticos, de los procesos de degradación y/o predecir el período de validez, del medicamento, en condiciones reales o naturales de almacenamiento. Los resultados de estudios acelerados, de estabilidad casi nunca permiten predecir, la evolución de los cambios físicos, en el producto bajo condiciones naturales de almacenamiento, y estos resultados de estudio acelerados de estabilidad, deben ser complementados por los estudios efectuados en condiciones de almacenamiento normales o en condiciones definidas de almacenamiento (36).

I.5.4.3 Estudios de estantería.

Estudios diseñados, para verificar la estabilidad del medicamento a partir de lotes de producción almacenados, bajo condiciones normales o naturales (36).

I.5.4.4 Ensayos de estrés.

Estudios que se realizan para dilucidar las características de estabilidad intrínsecas del principio activo o del producto, que normalmente se llevan a cabo bajo condiciones más severas que las utilizadas para estudios acelerados. Estos estudios permiten establecer las características de estabilidad inherentes de la molécula, así como las rutas de degradación. (19) (39). Se sabe que algunas rutas de degradación, pueden ser complejas y es probable que los productos de degradación, observados bajo condiciones forzadas no se formen en estudios acelerados o de estantería, sin embargo, esta información es útil en el desarrollo y validación de métodos analíticos adecuados.

Estos estudios, pueden ser realizados en una sola serie simple del principio activo y normalmente incluyen:



- Efecto de la temperatura en incrementos de 10° C (por ejemplo: 50° C, 60° C, etc).
- Efecto de la humedad cuando es apropiado (por ejemplo: 75 % HR. o más).
- Oxidación.
- Fotólisis.
- Susceptibilidad a la hidrólisis a través de un amplio rango de valores de Ph en solución o suspensión (19) (39).

✚ Los estudios de estrés aportan información sobre:

- Comportamiento del producto, ante períodos cortos fuera de las condiciones, de almacenamientos establecidos, lo que ayuda en la predicción de sus afectaciones ante fallos durante el embarque, por ejemplo.
- Parámetros de ensayo específicos, indicadores de la estabilidad.
- Patrones de degradación (39).

I.5.4.5 Condiciones de los estudios de estabilidad:

● **Fármacos nuevos:** (35) (36) (37) (40) (41).

Tipo de Estudio	Condiciones de Almacenamiento	Periodo Mínimo	Frecuencia de Análisis
Estabilidad acelerada	40°C ± 2°C/ 75% ± 5% HR	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a condición intermedia	30°C ± 2°C/ 65% ± 5% HR	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo	25°C ± 2°C/ 60% ± 5% HR	12 meses	0, 3 , 6 , 9 y 12 meses
	30°C ± 2°C/ 65% ± 5% HR		



● **Fármaco conocido:** (35) (36) (37) (40) (41)

Tipo de Estudio	Condiciones de Almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de Análisis
Estabilidad acelerada	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\% \text{ HR}$	3 meses	0, 1 y 3 meses
Estabilidad a condición intermedia**	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\% \text{ HR}$	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo*	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{ HR}$	6 meses (opción 1)	0, 3 y 6 meses
	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\% \text{ HR}$	12 meses (opción 2)	0, 3, 6, 9 y 12 meses

El producto, se debe evaluar bajo condiciones de almacenamiento, que permitan determinar su estabilidad térmica y, cuando es aplicable, su sensibilidad a la humedad. Si los estudios de estabilidad a largo plazo, se llevan a cabo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{ HR}$, y ocurren cambios significativos durante los 6 meses, del estudio de estabilidad acelerada, se deben llevar a cabo pruebas adicionales a la condición intermedia, y evaluar los resultados de acuerdo, a los criterios de cambio significativo. El estudio a la condición intermedia debe incluir todas las pruebas, a menos que se justifique lo contrario. Se deben presentar al menos datos de 0, 3 y 6 meses del estudio bajo esta condición al momento de solicitar el registro del medicamento, y continuar el estudio hasta 12 meses. La estabilidad a largo plazo para un fármaco con un periodo de reanálisis, propuesto de al menos 12 meses, debe continuar con una frecuencia de análisis de cada 3 meses el primer año, cada 6 meses el segundo año y después anualmente. Cuando ocurran cambios significativos entre los 3 y 6 meses del estudio de estabilidad acelerada, el periodo de reanálisis propuesto debe estar basado en los datos de estabilidad a largo plazo.

I.5.5 Parámetros a evaluar: los parámetros a evaluar en el caso de polvos y liofilizados son: concentración de fármaco, características organolépticas, humedad, y cuando proceda prueba de eficacia de conservadores y/o valoración de los mismos, esterilidad,



éstas se deben llevar a cabo en análisis inicial y final. Si el producto es para reconstituir, se debe preparar de acuerdo a las instrucciones indicadas en la etiqueta y los parámetros a examinar durante el periodo de conservación recomendado son: concentración del fármaco, características organolépticas y pH. (37) (40).

I.6 Período de Validez: Es el intervalo de tiempo en que se espera que un medicamento, después de su producción, permanezca dentro de las especificaciones aprobadas. Este período es utilizado para establecer la fecha de expiración individual de cada lote (36).

I.7 Período de Validez Comprobado: Es el lapso de tiempo, determinado mediante estudios de estabilidad en condiciones normales o naturales de almacenamiento o definidas por el fabricante, realizados con el producto envasado en su material de empaque-envase primario para comercialización (36).

I.8. Período de validez tentativo: Es un período de validez establecido, con carácter provisional no mayor a dos años, estimado por proyección de datos provenientes de estudios acelerados de estabilidad, efectuado con el producto envasado en el material de empaque primario utilizado para su comercialización. Este período de validez está sujeto a comprobación, mediante estudios de estabilidad en condiciones normales, o naturales de almacenamiento. (36)



Capítulo II. Materiales y Métodos.

II.1. Recolección, secado y molinado del material vegetal.

Materiales, utensilios y medios de medición.

- √ Material vegetal (*Parthenium hysterophorus*, Linn)
- √ Estufa MLW WLU – 100 (40 ± 1 °C)
- √ Molino de cuchillas regulable tipo Restsch Gmbh 5657 tipo SR.2.
- √ Tamiz de acero inoxidable de abertura de malla 0,315 mm

El material vegetal se recolectó de un entorno natural localizado, en las áreas correspondientes al Reparto Universitario de Santa Clara, de suelo predominante pardo con carbonatos, entre los meses de Octubre y Diciembre de 2006. Se empleó para la realización de este estudio, el sólido pulverulento obtenido a partir de las partes aéreas de la planta (hojas y tallos). El secado de la planta se efectuó en una estufa a una temperatura de 40 ± 1 °C en bandejas esmaltadas, durante un período de 72 horas, hasta peso constante. La planta seca se trituró en un molino de cuchillas regulable y se tamizó hasta obtener un sólido pulverulento con un tamaño de partícula $\leq 0,315$ mm. El sólido obtenido durante este procedimiento se empleó en todos los estudios que se describen en el presente trabajo.

II.2. Análisis granulométrico.

Materiales, utensilios y medios de medición.

- √ Tamices de 0,25; 0,18; 0,125; 0,10; 0,063; 0,045 mm.
- √ Balanza Técnica, Owlabor, error 0,01 g, LSP 160 g.
- √ Sólido pulverulento con tamaño de partícula $\leq 0,315$ mm.
- √ Vibrador de tamices, Marca CISA RP.20.



El análisis granulométrico se realizó por el método de tamización. Se tararon los tamices escogidos y se colocaron en orden decreciente de abertura de malla. En el tamiz superior se colocaron 100 g del sólido pulverulento. Se ajustó al vibrador de tamices a una frecuencia de vibración de 7 rev/min., durante 15 minutos. Seguidamente, se pesaron nuevamente los tamices y se calculó la fracción retenida en cada uno. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

II.3. Especificidad de la técnica analítica mediante Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC).

Materiales, utensilios y medios de medición.

- √ HPLC Knauer, utilizando un lazo de inyección de 10 μ L.
- √ Acetonitrilo para HPLC, Scharlau. España.
- √ Metanol, Scharlau. España.
- √ Agua desionizada y destilada.
- √ Filtro miliporo de 0,45 μ m, RC. Agilent Technologies.
- √ Microjeringuilla de 10 μ L Hamilton. Estados Unidos.
- √ Cristalería de laboratorio.
- √ Balanza analítica digital BOECO, error 0.1 mg, LSP 210 g. Alemania.
- √ Baño ultrasónico, BRANSON 1510. México.
- √ Rotoevaporador, BUCHI, R-200. Alemán.
- √ Lámpara de luz ultravioleta. CAMAG
- √ Micropipeta, LABMATE. Poland.
- √ Sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn. ($T_p \leq 0,315$ mm).
- √ Patrón de análisis (partenina aislada según Thomas, J ,2007).
- √ H₂O₂ al 3 %.
- √ NaOH 1N.
- √ HCL 1N.



- ✓ Papel de filtro Filtrak INGDR.
- ✓ Cloroformo, panreac. España.
- ✓ Acetona, Analar BDH. Reino Unido.
- ✓ Vainillina, Merck. Alemania.
- ✓ Ácido Acético glacial 98 %, panreac. España.
- ✓ Ácido Sulfúrico 95-98 %, Analar BDH. Reino Unido.
- ✓ Cromatofolios Al de Sílica gel 60, Fluka. Alemania.
- ✓ Cámara para cromatografía (25 x 10cm).

II.3.1. Preparación de las muestras de ensayo.

A) Preparación de la solución patrón (0,15 mg/mL).

Se pesó con exactitud 1,000 mg del patrón partenina aislada según experiencias de investigación anterior (47), se enrasó con metanol en un matraz aforado de 2 mL, se pipeteó una alícuota de 600 μ L y se enrasó con fase móvil acetonitrilo-agua (40:60) en un matraz aforado de 2 mL.

B) Preparación de la muestra.

Se pesó 0.1g de material vegetal y se colocó en un erlenmeyer con 8 mL de metanol. La muestra se introdujo en un baño ultrasónico, durante 10 minutos. Se filtró y se lavó con 3 mL de metanol, se repitió la extracción. Se reunieron los filtrados, y se concentró a vacío y se redisolvió en 4mL de metanol. Se pipeteó 1mL y se enrasó a 10 mL con fase móvil acetonitrilo-agua (40:60) en un matraz aforado.

C) Condiciones de estrés.

▲ **Agente oxidante:** Se pesó 0.1g de material vegetal, y se colocó en un erlenmeyer con 8 mL de metanol. La muestra se introdujo en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Se filtró y se lavó con 3 mL de metanol, se repitió la extracción. Se reunieron los filtrados y se la adicionaron 10 mL de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3 %, se refluxó durante 1 hora, se tapó y se protegió de la luz por 2 días, se concentró a vacío y luego se redisolvió en 4 mL de metanol, y se ajustó el pH en un intervalo entre 7 y 8 y se tomó 1mL y se enrasó a 10 mL con fase móvil (Acetonitrilo-Agua) (40:60) en un matraz aforado.



▲ **Medio ácido:** Se pesó 0.1g de material vegetal, y se colocó en erlenmeyer con 8 mL de metanol. La muestra se introdujo en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Se filtró y se lavó con 3 mL de metanol, se repitió la extracción. Se reunieron los filtrados y se adicionó 10 mL de HCL 1N, se reflujo durante 1 hora, y se concentró a vacío y luego se redisolvió en 4mL de metanol y se ajustó el pH a un intervalo entre 7 y 8 y se pipeteó 1mL y se enrasó a 10 mL con fase móvil (Acetonitrilo-Agua) (40:60) en un matraz aforado.

▲ **Medio básico:** Se pesó 0.1g de material vegetal y se colocó en un erlenmeyer con 8 mL de metanol. La muestra se introdujo en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Se filtró y se lavó con 3 mL de metanol, se repitió la extracción. Se reunieron los filtrados y se adicionó 10 mL de NaOH 1N, se reflujo durante 1 hora, y se concentraron a vacío y luego se redisolvió en 4 mL de metanol y se ajusto el pH a un intervalo entre 7 y 8, a continuación se pipeteó 1mL y se enrasó a 10 mL con fase móvil (Acetonitrilo-Agua) (40:60) en un matraz aforado.

▲ **Luz natural:** Se colocó en una placa petri de forma extendida 0,1 g del polvo y se mantuvo bajo el efecto de la luz solar durante un período de tiempo de 8 horas, a continuación se procedió según la metodología de preparación de muestra descrita en el acápite II.3.1 (B).

▲ **Luz artificial:** Se extendió en una placa petri 0,1 g del polvo y se mantuvo bajo el efecto de la luz ultravioleta durante 2 horas, a continuación se procedió según la metodología de preparación de muestra descrita en el acápite II.3.1 (B).

II.3.2. Perfiles de HPLC.

Se realizó la inyección de las muestras descritas en el epígrafe II.3.1, filtrando previamente por filtro miliporo de 0,45 μm y se inyectó en el equipo 10 μL de cada una, bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Fase estacionaria: LiChrospher RP- 18 (5 μm) (4.6 * 250 nm).
- Fase móvil: acetonitrilo – agua (40: 60).
- Flujo: 1 mL/min.



- Detector: de longitud de onda variable.
- Longitud de onda de detección: 210 nm.
- Volumen de inyección: 10 µL

II.3.3. Expresión de los resultados.

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

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

A_p : Área bajo la curva del patrón.

A_m : Área bajo la curva de la muestra.

C_m : Concentración de la muestra. (mg/mL)

C_p : Concentración del patrón. (mg/mL)

La determinación de la concentración de la partenina, ingrediente activo, se realizó en base seca, al considerar un % de humedad residual correspondiente a un valor de 10 % y se determinó a través de la expresión:

$$\%p = \frac{A_m \cdot C_p \cdot 40}{A_p \cdot Pms} \times 100$$

Donde:

A_p : Área bajo la curva del patrón

A_m : Área bajo la curva de la muestra

C_p : Concentración del patrón (mg/mL)

Pms : peso de la muestra seca

40: Factor de corrección.

Se realizó además, el cálculo del por ciento sin degradar de partenina con relación a su concentración en la muestra inicial a tiempo cero. El procesamiento estadístico de los resultados se desarrolló mediante el SPSS para Windows 13/2004. Se realizó un análisis de varianza Anova al comparar la concentración de partenina en las variantes evaluadas con su contenido en la muestra inicial (tiempo cero).



II.4. Cromatografía en capa delgada cualitativa (CCD).

Materiales, utensilios y medios de medición.

- √ Cromatofolios Al Silica gel GF 60 dimensiones (8.1 x 4.5 cm.).
- √ Metanol, Scharlau. España.
- √ Agua desionizada y destilada.
- √ Filtro miliporo de 0,45 μm , RC. Agilent Technologies.
- √ Microjeringuilla de 10 μL Hamilton. Estados Unidos
- √ Lámpara de luz ultravioleta. CAMAG
- √ Vainillina 1 % en etanol
- √ Patrón de análisis (partenina aislada según Thomas, J ,2007).
- √ Muestras sometidas a diferentes condiciones degradativas. (Epígrafe II.3.1).
- √ Matraces aforados de 2 mL.

Se realizó un seguimiento cualitativo mediante la cromatografía en capa delgada a las muestras sometidas, a los diferentes condiciones degradativas (estrés), en comparación con el comportamiento cromatográfico de la solución de referencia. La preparación de muestra para cada condición degradativa coincide con lo reportado en el acápite II.3.1 (C). Se aplicaron 20 μL de cada variante analizada, y del patrón de referencia en cromatofolios al de sílica gel 60 de dimensiones (8.1 x 4.5 cm.). Se desarrolló el cromatograma a temperatura ambiente, en una cámara cromatográfica saturada con la fase móvil cloroformo: acetona (6:2). Posteriormente, las placas se revelaron con luz ultravioleta a una $\lambda = 254 \text{ nm}$ y luego con una solución de vainillina en etanol con la siguiente composición: 0,5g de vainillina, 9 mL de etanol, 0,5 mL de $\text{H}_2\text{SO}_{4(c)}$ y 3 gotas de ácido acético glacial, con calentamiento posterior a una temperatura de 70 $^{\circ}\text{C}$ en una estufa de calentamiento. Se calculó la razón de flujo (Rf) de las manchas obtenidas en los cromatogramas de las muestras analizadas sometidas a los diferentes condiciones degradativas en comparación con la solución de referencia.



II.5. Caracterización cualitativa de los posibles productos de degradación mediante espectrofotometría ultravioleta.

Materiales, equipos y reactivos.

- √ Sólido pulverulento con tamaño de partícula $\leq 0,315$ mm.
- √ Muestras de análisis sometidas a las condiciones de estrés. (Acápite II.3.1 C).
- √ Metanol, Scharlau. España.
- √ Agua destilada.
- √ Cristalería de laboratorio.
- √ Papel de filtro Filtrak INGDR.
- √ Espectrofotómetro Ultravioleta *Genesys 10*.

A) Muestra inicial.

Se obtuvo el espectro UV de la solución obtenida al disolver 0,5 g del sólido pulverulento en metanol utilizando un Espectrofotómetro Ultravioleta *Genesys 10*, en el intervalo de 200 a 300 nm. Se empleó como solución compensadora el metanol.

B) Medio ácido.

La muestra de ensayo concentrada a sequedad, se redisolvió en 2 mL de metanol, se enrasó en matraz aforado de 2 mL. Se registró la lectura de absorbancia en el intervalo de 200 a 300 nm, empleando como blanco el metanol.

C) Medio básico.

La muestra de ensayo concentrada a sequedad, se redisolvió en 2 mL de metanol, se enrasó en matraz aforado de 2 mL. Se registró la lectura de absorbancia en el intervalo de 200 a 300 nm, empleando como blanco el metanol.

▲ Solubilidad.

Se analizó la solubilidad del precipitado obtenido en HCl al 1 % y en agua.

D) Degradación oxidativa.

La muestra de ensayo concentrada a sequedad, se redisolvió en 2 mL de metanol, se enrasó en matraz aforado hasta un volumen constante. Se registró la lectura de



absorbancia en el intervalo entre 200-300 nm, empleando como solución compensadora el metanol.

II.6. Estudio de estabilidad.

Materiales, utensilios e instrumentos de medición.

- ✓ Sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn. ($T_p \leq 0,315$ mm).
- ✓ Balanza Analítica Boeco. Germany.
- ✓ Frascos de cristal ámbar, protegidos de la luz.
- ✓ Frascos de cristal ámbar, protegidos de la luz, con tapón de goma.
- ✓ Ácido Sulfúrico 98 %. Panreac Química SA.
- ✓ Desecadoras.
- ✓ Estufa MLW WLU – 100 (40 ± 1 °C).

II.6.1 Procedimiento experimental.

Se pesó tres réplicas correspondientes a 0,1 g del sólido pulverulento se colocaron en frascos ámbar y protegidos de la luz, y se mantuvieron durante tres meses en las siguientes condiciones:

Estudio de estabilidad acelerada: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ HR

- Condición del envase: frasco ámbar con tapón de goma protegido de la luz. (ICH, 2003)

Ensayo de estrés de humedad: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/80\% \pm 5\%$ HR (ICH, 2003)

- Condición del envase: frasco destapado protegido de la luz.

Estabilidad a largo plazo: $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\%$ HR (ICH, 2003)

- Condición del envase: frasco ámbar con tapón de goma protegido de la luz.

▲ **Preparación de las muestras de ensayo:** Coincide con lo reportado en el acápite II.3.1 (B).



▲ **Análisis de las características organolépticas:** Se observó el comportamiento organoléptico, teniendo en cuenta el olor, color, sabor y aspecto de los sólidos pulverulentos a tiempo inicial y a los tres meses.

▲ **Análisis Químico:** Se aplicó la técnica de determinación cuantitativa de partenina en los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn., mediante HPLC desarrollada para determinar el contenido de su principal ingrediente activo, la partenina, a tiempo inicial y a los tres meses. (45). Se realizó el cálculo del por ciento sin degradar de partenina con relación a su concentración en la muestra inicial a tiempo cero.

▲ **Perfiles de HPLC:** Coincide con lo reportado en el acápite II.3.2.

▲ **Expresión de los resultados:** Coincide con lo reportado en el acápite II.3.3.

▲ El procesamiento estadístico de los resultados se desarrolló mediante el SPSS para Windows 13 / 2004. Se realizó un análisis de varianza Anova al comparar la concentración de partenina en las variantes evaluadas con su contenido en la muestra inicial. (tiempo cero)



Capítulo III. Análisis y Discusión de los Resultados.

III.1. Análisis granulométrico.

Análisis de la distribución del tamaño del tamaño de partícula.

Se desarrolló un análisis de distribución de tamaño de partícula ampliando el intervalo de abertura de malla de los tamices en relación a los empleados en investigaciones previas (9). Se obtuvo una distribución correspondiente a una campana gaussiana normal. (Fig.2). Dichos resultados coinciden con los obtenidos por (Hernández, 2006) (9), y se logra al ampliar el número de tamices un comportamiento más cercano a una campana de distribución normal ideal. Según los resultados obtenidos en el análisis de la distribución del tamaño de partícula se evidencia la presencia de un alto por ciento de polvo fino comprendido en el intervalo de 0,1-0,18 mm, según clasificación de la USP (42). Atendiendo a lo planteado se debe esperar afectaciones en las propiedades reológicas del polvo, más aún si se trata de sólidos pulverulentos de origen natural que tienden a ser higroscópicos.

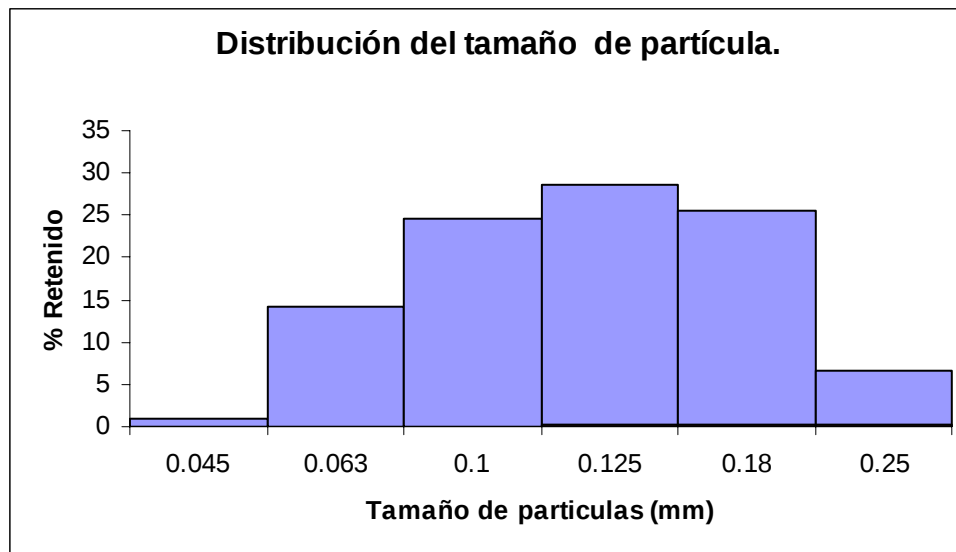


Fig. 2. Distribución del tamaño de partícula del sólido pulverulento.



III.2. Especificidad de la técnica analítica mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Se evaluó la especificidad de la técnica analítica mediante HPLC con vistas a su aplicación en estudios de estabilidad del sólido pulverulento y para esto se valoró la posible interferencia de productos de degradación con relación en la respuesta cromatográfica del ingrediente activo principal. Se analizó el perfil cromatográfico de cada condición analizada, al ser sometidas las muestras de ensayo a degradaciones en diferentes condiciones extremas que propiciaron la degradación del ingrediente activo. En el desarrollo cromatográfico se evaluó la sustancia de referencia y una muestra sometida a las condiciones drásticas: medio ácido (HCL 1N), medio básico (NaOH 1 N), oxidación (H_2O_2 al 3 %), luz natural y ultravioleta, teniendo en cuenta lo establecido en las normas de la conferencia internacional de armonización (ICH, 1996) al evaluar la especificidad de técnicas de análisis frente a posibles productos de degradación. El cromatograma obtenido mediante HPLC de la sustancia de referencia y de la muestra inicial a tiempo cero, evidencian un pico cromatográfico bien definido y resuelto a un tiempo de retención de 5,2 correspondiente al ingrediente activo de interés (Fig.3) (Fig.4)

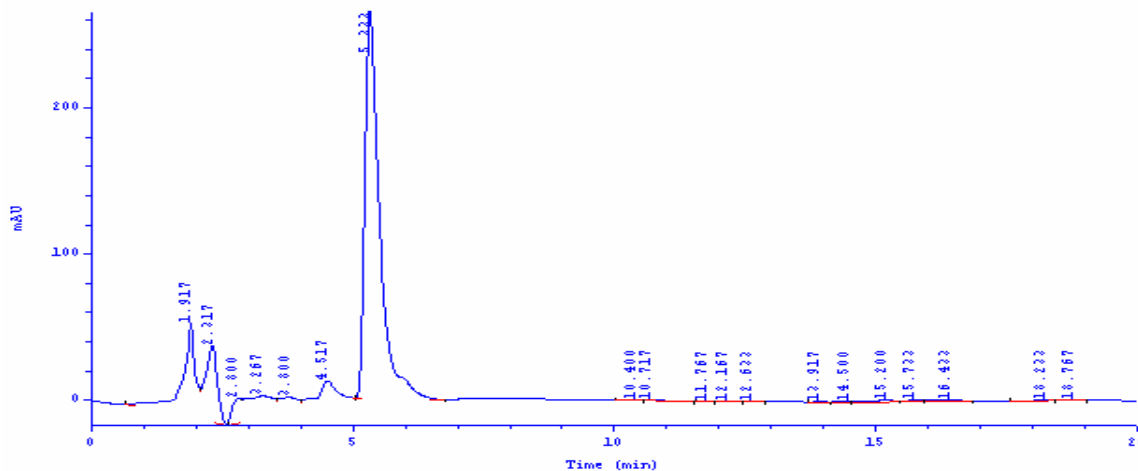


Fig. 3. Cromatograma obtenido mediante HPLC para la solución de referencia.

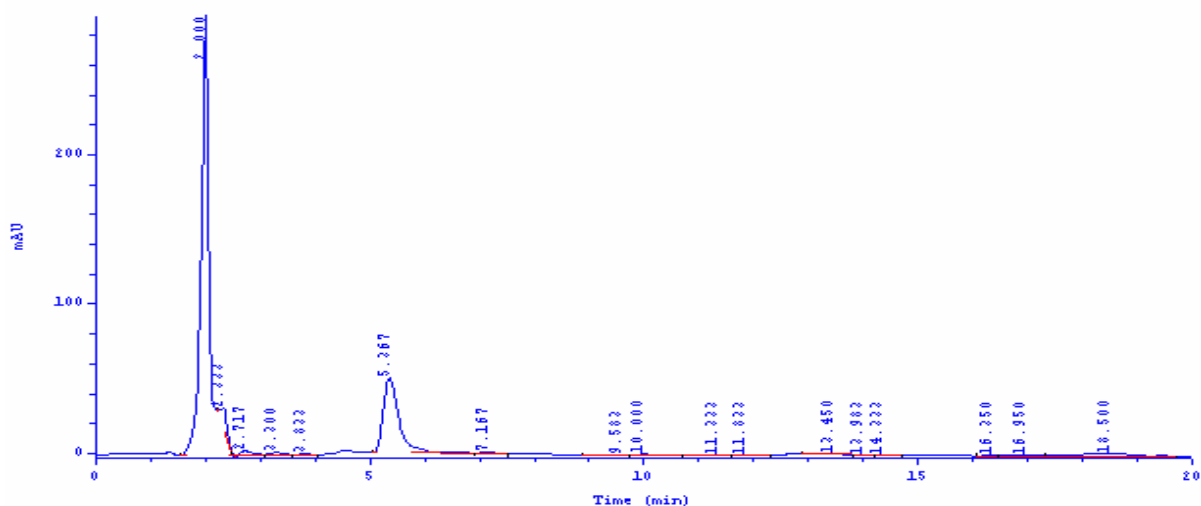


Fig. 4. Cromatograma obtenido mediante HPLC para la muestra inicial a tiempo cero.

🚩 **Medio básico:** Se obtiene un pico en el cromatograma obtenido mediante HPLC a un tiempo de retención (tr) de 7,2 min, lo cual podría darnos un criterio de la presencia de un producto de degradación de mayor apolaridad con relación al ingrediente principal, la partenina. Los resultados de la concentración de ingrediente activo (%) muestra una reducción significativa con relación al contenido de partenina en la muestra inicial a tiempo cero, evidenciando la marcada degradación en dicha condición (Tablas 1 y 2) (Fig.5).

Tabla 1. Concentración de partenina (%) en la muestra de análisis a tiempo cero.

Muestras a tiempo cero		Concentración (%)
Réplicas	Réplica 1	0,9527
	Réplica 2	0.9986
	Réplica 3	0,9997
Promedio		0,98366



Condiciones de estrés		Medio básico	Medio oxidante	Medio ácido	Luz artificial (UV)	Luz natural
Concentración de partenina (%)	Réplica 1	0,01508	0,0352	0,1478	0,4559	0,9357
	Réplica 2	0,01432	0,0542	0,1457	0,4653	0,9543
	Réplica 3	0,02931	0,0345	0,1632	0,4321	0,9876
Promedio de concentración (%)		0,01957	0,0413	0,1522	0,4511	0,9592
% de partenina sin degradar		2,0	4,0	15,0	46,0	97,0

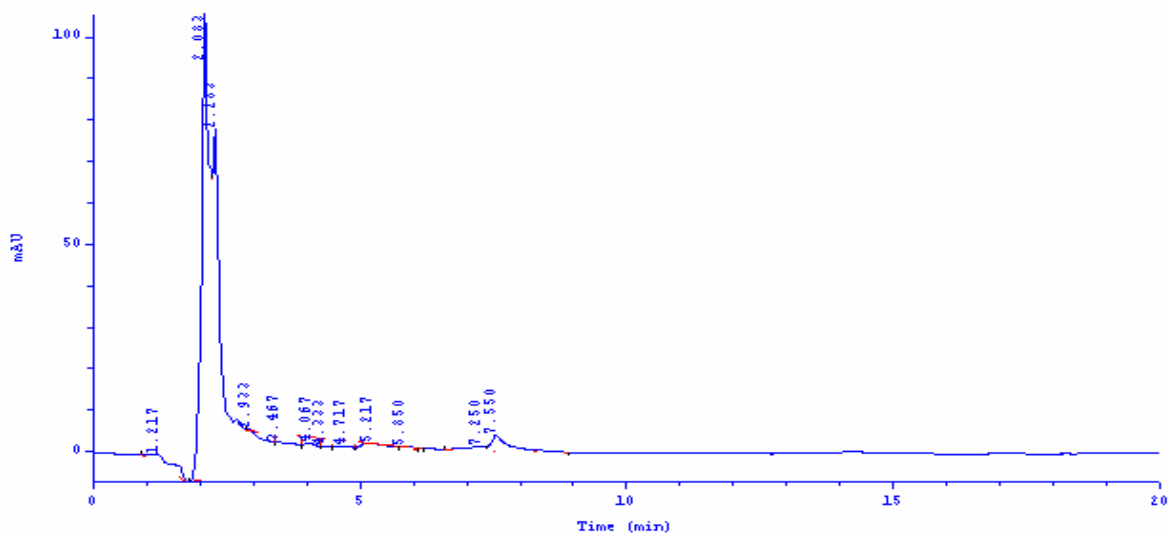


Fig. 5 .Cromatograma obtenido mediante HPLC para la muestra de análisis en medio básico.

🚩 **Medio ácido:** Se obtiene un pico en el cromatograma de HPLC a un tiempo de retención (tr) de 6,3 min, bien definido, sin colas, ni solapamientos. Los resultados de la



concentración de ingrediente activo (%) muestran una reducción significativa con relación al contenido de partenina en la muestra inicial a tiempo cero (Tablas 1 y 2) (Fig.6)

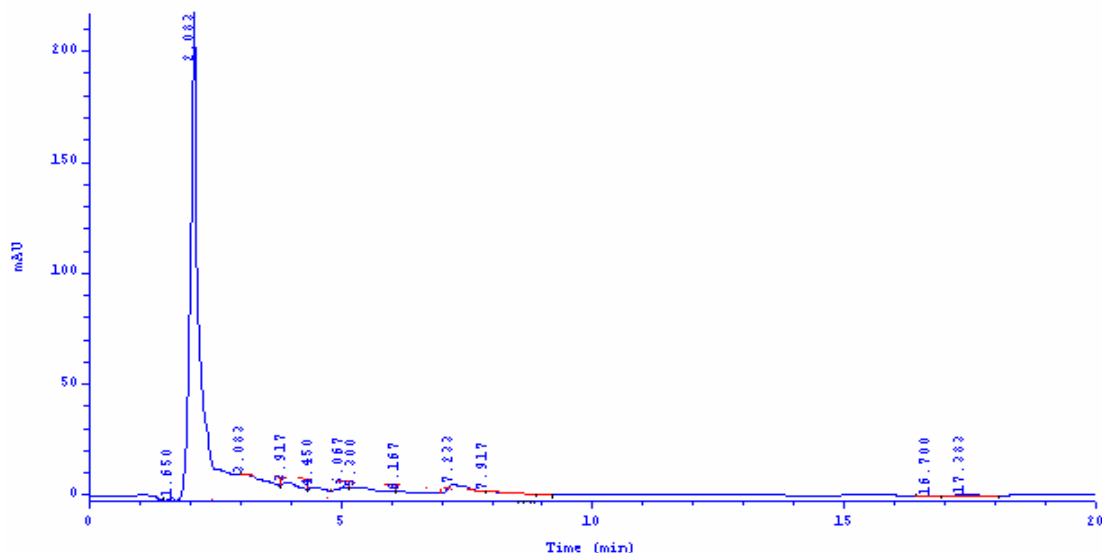


Fig. 6. Cromatograma obtenido mediante HPLC para la muestra de análisis en medio ácido.

Agente Oxidante: Se obtiene un pico en el cromatograma de HPLC a un tiempo de retención (tr) de 7,3 min., con ausencia de picos solapados. Los resultados de la concentración de ingrediente activo (%) muestran una reducción significativa con relación al contenido de partenina en la muestra sin degradar (Tablas 1 y 2) (Fig.7).

Luz natural: Se obtiene un pico en el cromatograma de HPLC a un tiempo de retención (tr) de 7,05 min., con ausencia de picos solapados. Los resultados de la concentración de ingrediente activo (%) muestran la no existencia de diferencias significativas con relación al contenido de partenina en la muestra sin degradar (Tablas 1 y 2) (Fig.8).

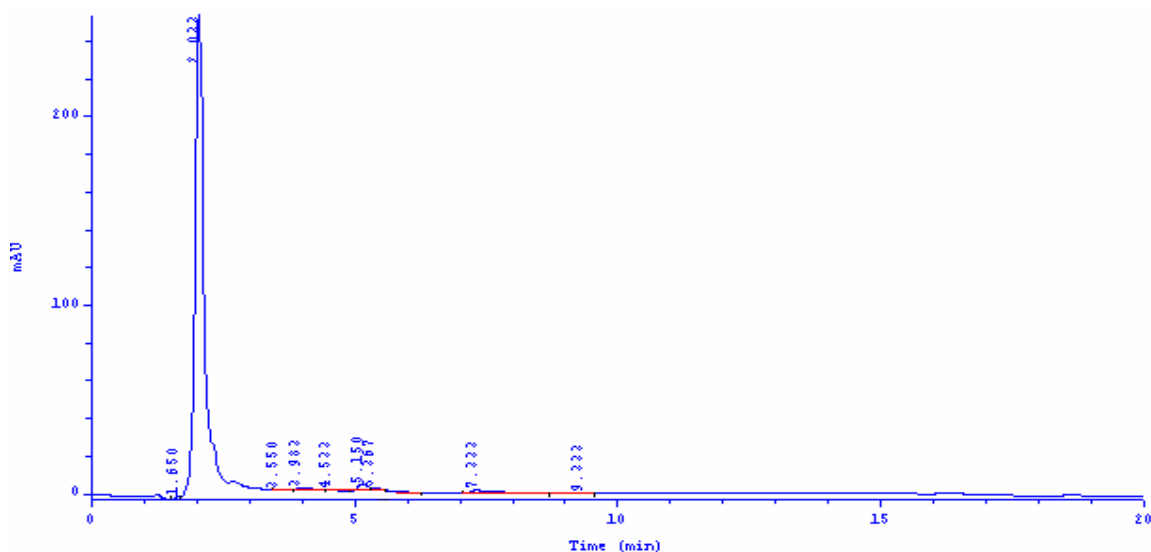


Fig. 7. cromatograma obtenido mediante HPLC para la muestra de análisis en medio oxidante.

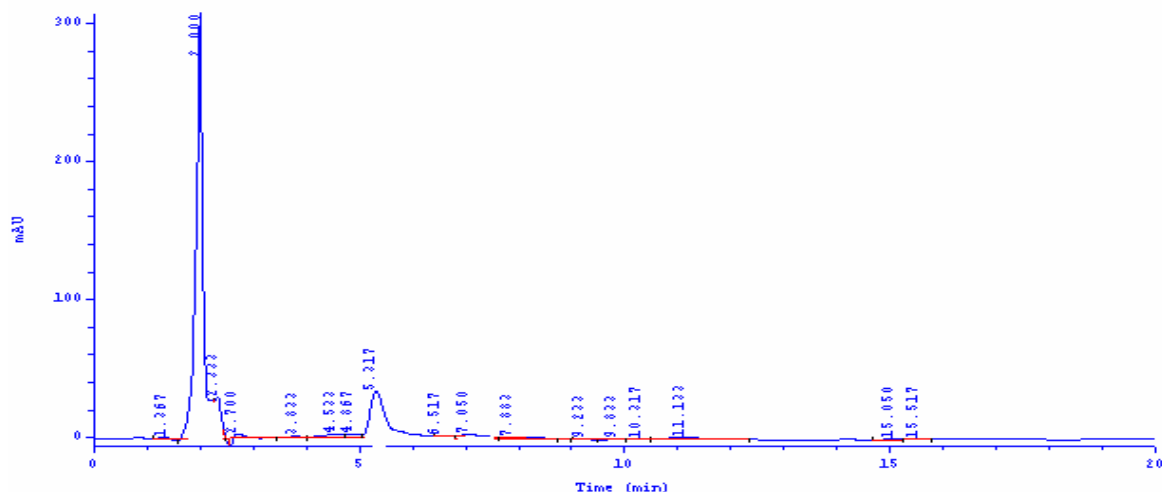


Fig. 8. Cromatograma obtenido mediante HPLC para la muestra de análisis bajo el efecto de la luz natural.

Luz artificial: Se obtiene un pico en el cromatograma de HPLC a un tiempo de retención (tr) de 7,71 min, con ausencia de picos solapados, lo cual evidencia la formación de un posible producto de degradación de estructura química similar y de una mayor apolaridad.



Teniendo en cuenta las condiciones cromatográficas establecidas, los resultados de la concentración de ingrediente activo (%) muestran una reducción significativa con relación al contenido de partenina en la muestra sin degradar (Tablas 1 y 2) (Fig.9).

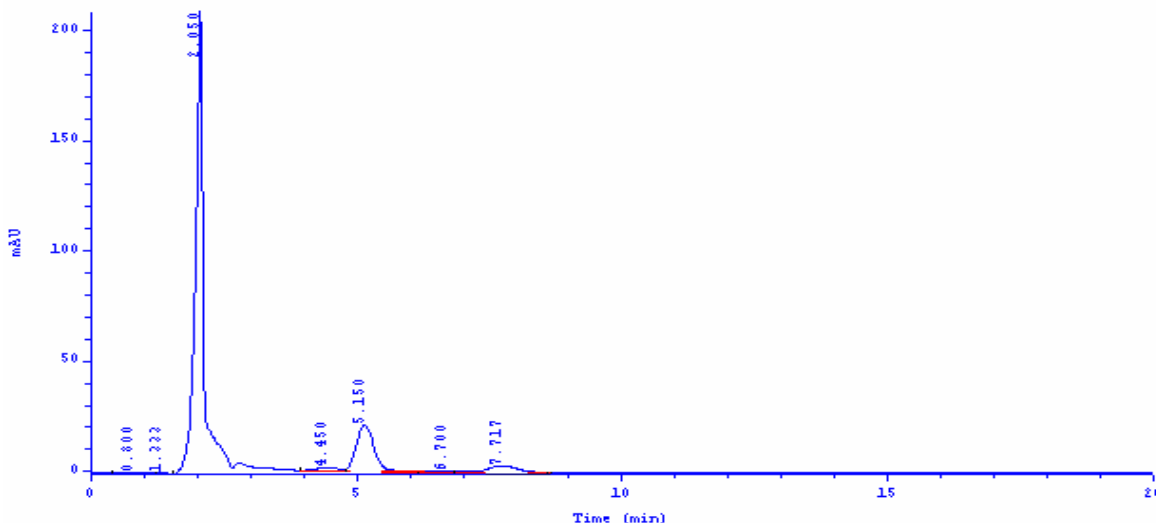


Fig. 9. Cromatograma obtenido mediante HPLC para la muestra de análisis bajo el efecto de la luz artificial.

El análisis comparativo de los cromatogramas obtenidos para la sustancia de referencia, muestra inicial a tiempo cero y las muestras sometidas a las condiciones de degradación drásticas (Fig. 3-9), demuestra la especificidad del método analítico mediante HPLC, al no evidenciarse interferencias, ni solapamientos con relación al pico que eluyó a un tiempo de retención de 5,2 min. correspondiente al ingrediente activo principal.

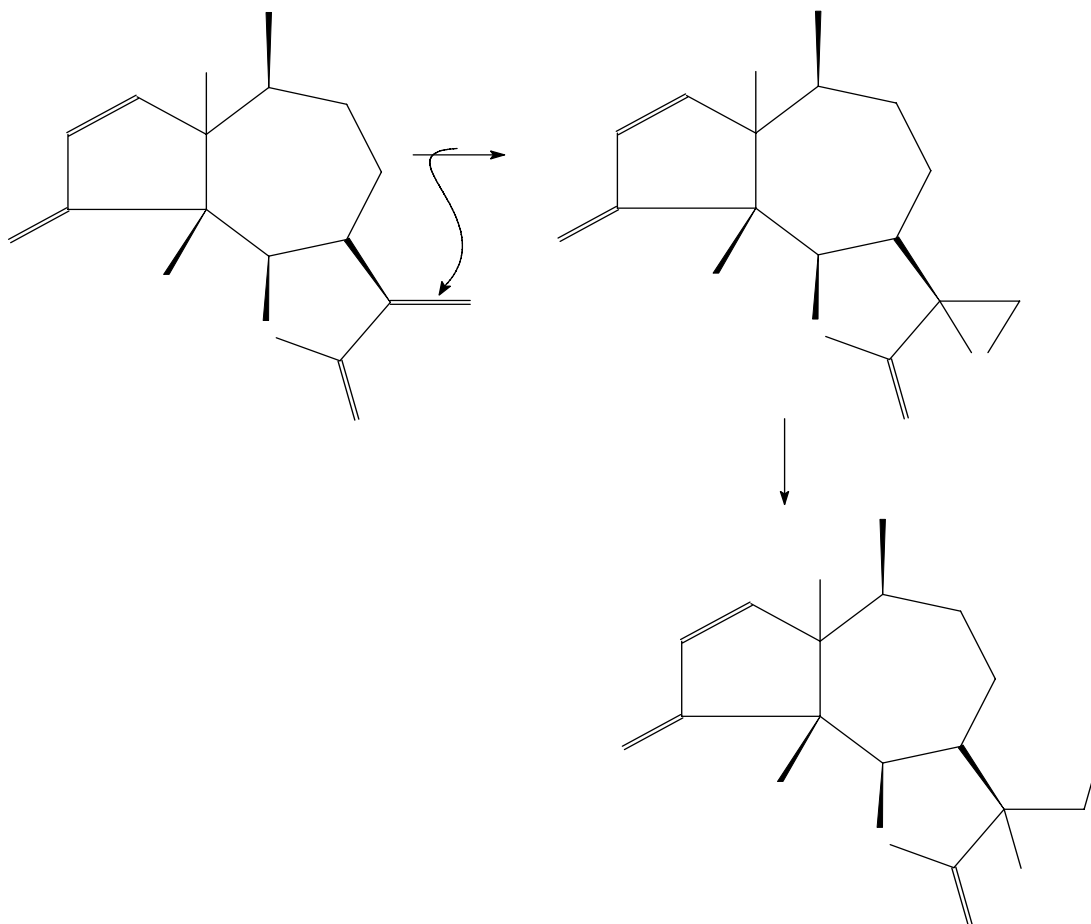
El procesamiento estadístico de los resultados mediante el paquete estadístico SPSS para Windows 13/2004 evidenció la existencia de diferencias significativas en cada variante degradativa con relación a la concentración de partenina en la muestra inicial a tiempo cero (Anexo I). Atendiendo a los resultados obtenidos, la mayor incidencia en la concentración de partenina es la condición degradativa en medio básico, que alcanza prácticamente el 100 % de degradación, seguida de la degradación oxidativa, posteriormente la del medio ácido y finalmente se muestra que la menor afectación se



obtiene bajo el efecto de la luz artificial y natural. Este resultado podría ser correlacionado con la predicción teórica de los posibles productos de degradación, que mostramos a continuación.

Medio oxidante:

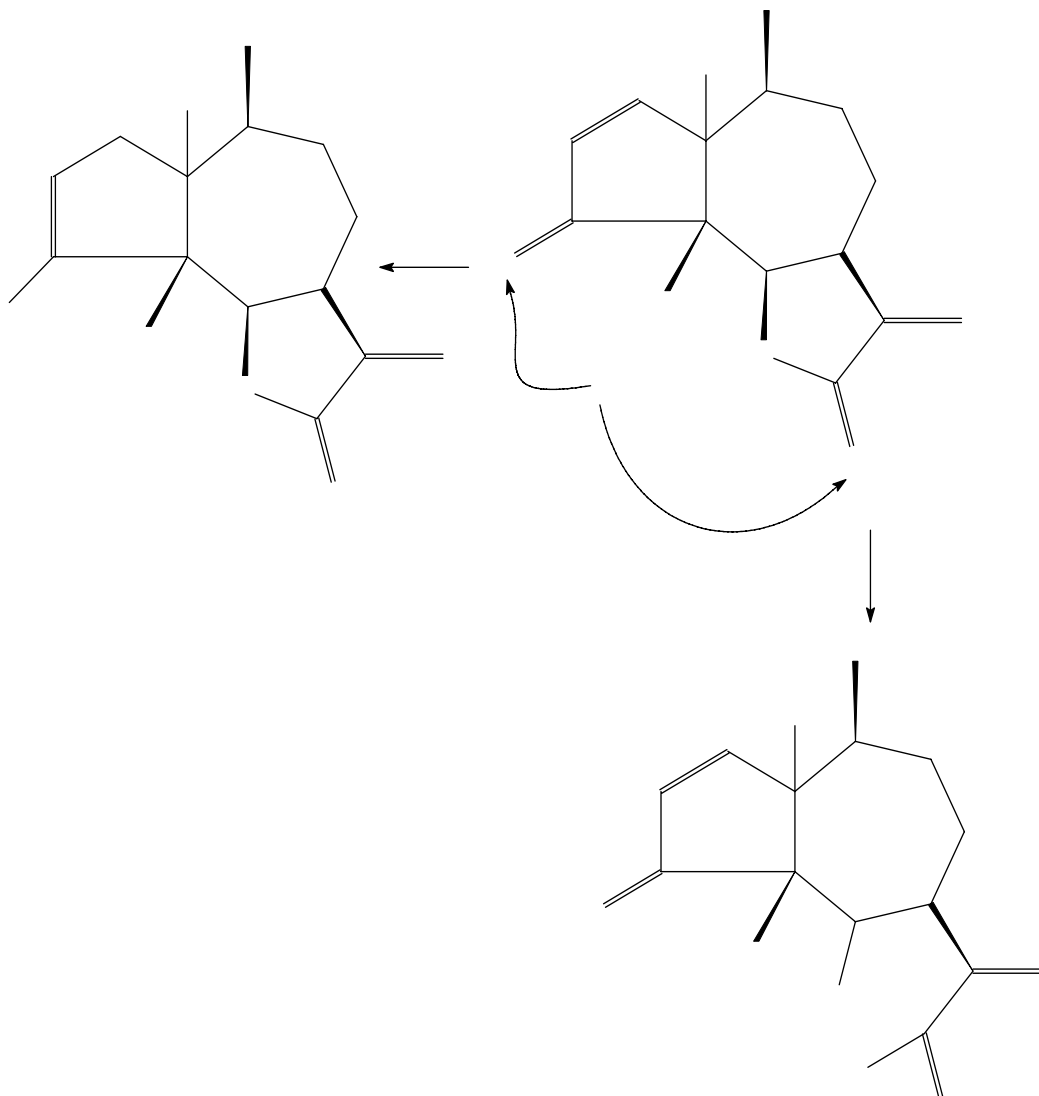
- ✚ En el medio oxidante podría ocurrir una reacción de oxidación de alquenos que conduce a la formación de un epóxido que finalmente pudiera formar un diol.





Medio ácido:

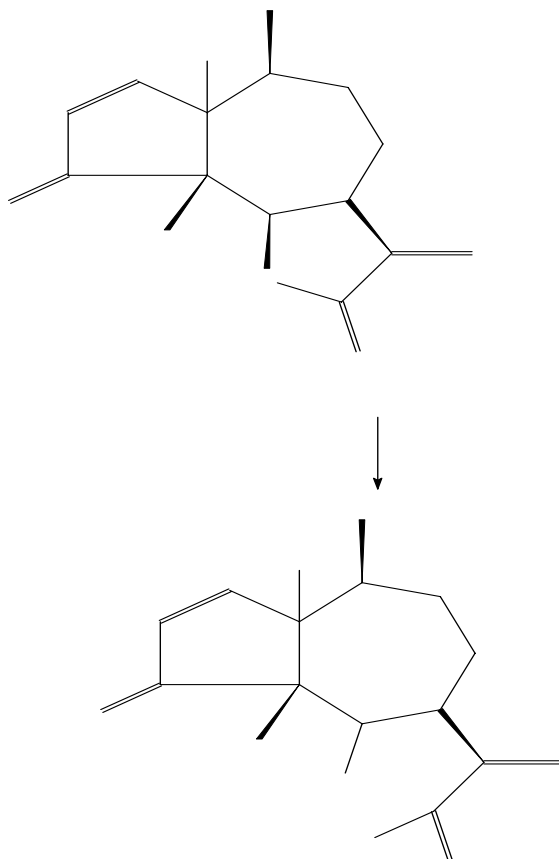
- ✚ En el medio ácido podría ocurrir una reacción de protonación de un grupo carbonilo de cetona α - β insaturado con posible formación posterior de un enol.





Medio básico:

- ✚ En el medio básico podría ocurrir una reacción de hidrólisis formando la sal del ácido carboxílico más un alcohol.



Luz artificial:

- ✚ La luz artificial ocasiona reacciones degradativas similares a las descritas con anterioridad, con mayor incidencia, al estimular la formación de radicales muy reactivos y aumentar la posibilidad de formar productos colaterales.



III.3. Cromatografía en capa delgada cualitativa (CCD).

Se desarrolló la CCD como técnica de análisis complementaria, dando seguimiento desde el punto de vista cualitativo a las posibles interferencias potenciales en los métodos analíticos desarrollados. La determinación de las razones de flujo (R_f) de cada una de las muestras analizadas, sometidas a las diferentes condiciones degradativas en comparación con la solución de referencia evidenció los siguientes resultados:

✚ **Medio básico:** Aparición de una mancha fluorescente a la luz ultravioleta a un valor de R_f de 0,67. Se detectó la presencia a la luz ultravioleta de una segunda mancha fluorescente con un valor de R_f de 0,98, que no se detecta al revelado con vainillina.

✚ **Medio ácido:** Aparición de una mancha fluorescente a la luz ultravioleta y de color carmelita al revelado con vainillina con un valor de R_f de 0,125. Se evidenció la presencia de una segunda mancha fluorescente a la luz ultravioleta y de color verde al revelado con vainillina con un valor de R_f de 0,93.

✚ **Agente oxidante:** Aparición de una mancha fluorescente a la luz ultravioleta y de color carmelita al revelado con vainillina con un valor de R_f de 0,26. Se evidenció la presencia de una segunda mancha fluorescente a la luz ultravioleta, que no se detecta al revelado con vainillina, con un valor de R_f de 0,98.

Atendiendo a los resultados anteriores se demuestra la presencia de posibles productos de degradación en cada uno de los medios analizados. Se detectan dos nuevas sustancias en cada condición, en comparación con la sustancia de referencia, que flúorese a la luz ultravioleta y presenta coloración azul violácea al asperjado con vainillina y que se caracteriza por un valor de R_f de 0,5.



III.4. Comportamiento en el UV de los posibles productos de degradación.

✚ **Muestra inicial:** El espectro UV del sólido pulverulento en metanol en el intervalo de 200 a 300 nm muestra la presencia de un máximo de absorción a 215 nm, correspondiente a una transición ($\pi-\pi^*$) característica de las enonas (Fig.10).

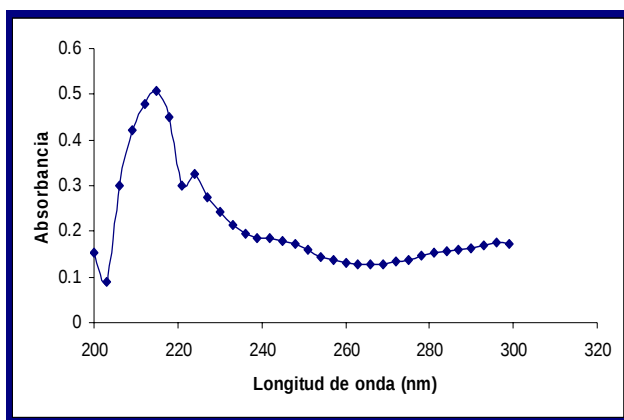


Fig.10. Espectro UV del sólido pulverulento del Parthenium hysterophorus, Linn en metanol.

✚ **Medio ácido. Caracterización espectrofotométrica cualitativa.**

El espectro UV de la muestra objeto de análisis sometida a la degradación en medio ácido evidencia la presencia un máximo de absorción a una longitud de onda de 206 nm (Fig.11)

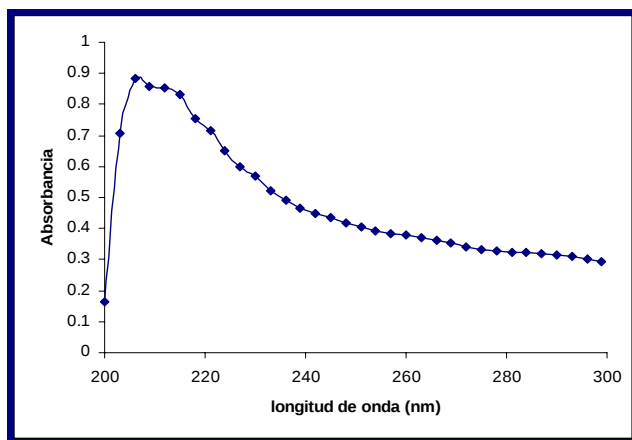


Fig. 11. Espectro UV de la muestra de análisis sometida a degradación en medio ácido.



Medio básico. Caracterización espectrofotométrica cualitativa.

El espectro UV de la muestra sometida a la degradación en medio alcalino evidencia la presencia un máximo de absorción a una longitud de onda de 212 nm, correspondiente a una transición de origen ($\pi-\pi^*$) (Fig.12).

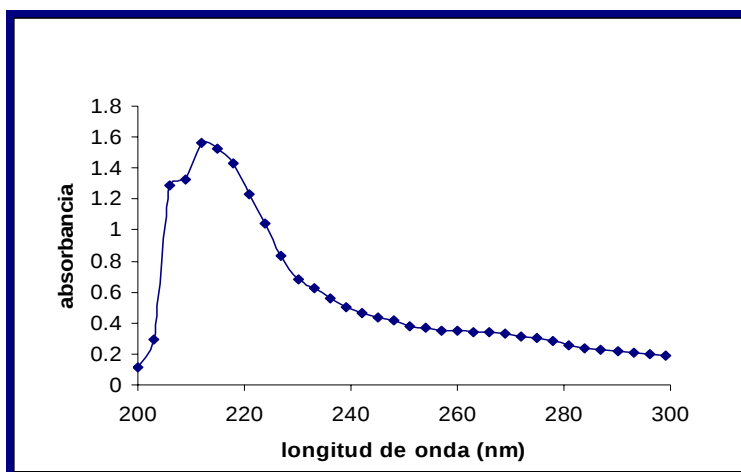


Fig. 12. Espectro UV de la muestra de análisis sometida a degradación en medio alcalino.

▲ Solubilidad del producto cristalizado.

El producto que cristaliza en forma de finas agujas blanquecinas, es soluble en ácido clorhídrico 1 % y en agua, lo cual nos sugiere que se obtuvo bajo esta condición una sal, teniendo en cuenta las consideraciones teóricas sobre un posible mecanismo de degradación en medio básico.

Degradación oxidativa. Caracterización espectrofotométrica cualitativa.

El espectro UV de la muestra sometida a la degradación oxidativa con peróxido de hidrógeno al 3 %, evidencia la presencia de un máximo de absorción a 221 nm, correspondiente a una transición ($\pi-\pi^*$), lo cual corrobora el pico característico de las enonas entre 215- 250 nm (Fig.13).

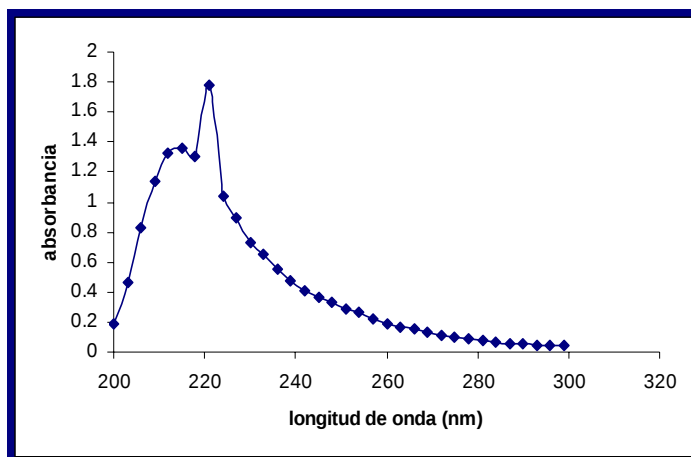


Fig. 13. Espectro UV de la muestra de análisis sometida a degradación en medio oxidativo.

Los espectros UV obtenidos como resultado de la evaluación de las muestras sometidas a cada medio de degradación (ácido, básico, oxidativo), mostraron máximos de absorción, característicos de la banda de transición ($\pi-\pi^*$) de las enonas, lo cual infiere la presencia de posibles productos de degradación de estructura química similar a la partenina y confirma, además, que éste método analítico no es recomendable en la realización de estudios de estabilidad del sólido pulverulento.



III.5. Estudio de estabilidad.

III.5.1. Condición estrés.

Atendiendo a la incidencia de factores tales como la temperatura, humedad y luz en la estabilidad química del sólido pulverulento, evaluada en los estudios de estabilidad en fase sólida inicial (9), se evaluó el polvo sometido a estrés de humedad. El sólido pulverulento almacenado en frascos protegidos de la luz, sin tapa y expuestos a una temperatura de 25 °C y 80 % HR (Fig.14), muestra una disminución marcada en la altura del pico correspondiente a la partenina, lo que evidencia la existencia de diferencias significativas con relación a la concentración de este ingrediente activo en el material vegetal. El análisis de dicha condición de almacenamiento nos permitió analizar la incidencia de la humedad como factor independiente al controlar otros factores tales como la temperatura y la luz. Lo anteriormente planteado nos permite concluir que la humedad es un factor que afecta la estabilidad del componente principal, caracterizada por una degradación que no supera el 30 % (Tablas 3 y 4).

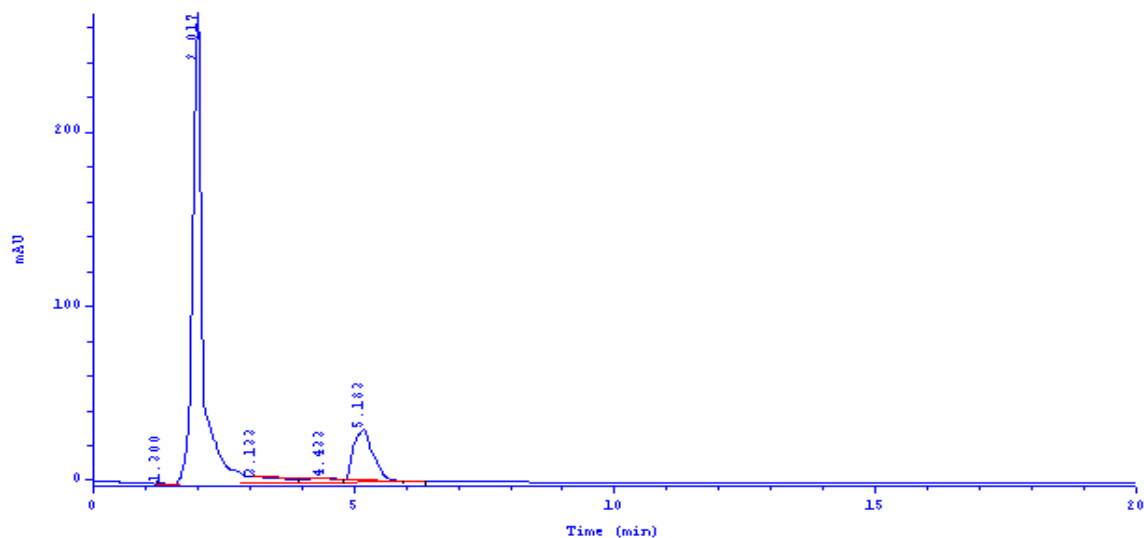


Fig.14. Cromatograma HPLC obtenido para la muestra de análisis bajo la influencia de la humedad.



Tabla.3. Concentración de partenina (%) en las muestras de análisis bajo las condiciones experimentales establecidas.

Condiciones establecidas		Concentración (%) 3 meses	Promedio
40°C ± 2°C/75% ± 5% HR (frascos protegidos de la luz tapados)	Réplicas	0,3776	0,3591
		0,3543	
		0,3456	
30°C ± 2°C/65% ± 5% HR (frascos protegidos de la luz tapados)	Réplicas	0,5832	0,5842
		0,5764	
		0,5932	
25°C ± 2°C/80% ± 5% HR (frascos protegidos de la luz destapado)	Réplicas	0,7412	0,7282
		0,7201	
		0,7234	

Tabla. 4. Valores del % de partenina sin degradar en relación a su concentración inicial.

Condiciones establecidas	% sin degradar (partenina)
40°C ± 2°C/75 % ± 5 % HR (frascos ámbar protegidos de la luz tapados)	36,0
30°C ± 2 °C/65 % ± 5% HR (frascos ámbar protegidos de la luz tapados)	59,0
25°C ± 2 °C/80 % ± 5 % HR (frascos ámbar protegidos de la luz destapados)	74,0



III. 5.2. Estabilidad acelerada y de vida estante.

Considerando los resultados de trabajos previos desarrollados con el sólido pulverulento del *Phartenium histerophorus*, Linn⁽⁹⁾ y con el objetivo de tener criterios acerca de la estabilidad química de la partenina en el mismo se desarrolló un estudio de estabilidad acelerada y de vida de estante según se describe en las ICH (2003) (35) a muestras conservadas en envases que controlan la incidencia de factores que aceleran su degradación (Frasco de vidrio de color ámbar con tapón de goma protegidos de la luz con papel de aluminio).

+ Análisis de las características organolépticas.

- Durante el tiempo de estudio transcurrido en cada una de las condiciones de almacenamiento, no se observó ningún cambio significativo en el color, olor y el aspecto de los sólidos pulverulentos.

+ Análisis químico.

- Al cabo de tres meses de mantener al sólido pulverulento en condiciones de envejecimiento natural y aceleradas la concentración de partenina muestra una disminución significativa en ambas condiciones, que alcanza valores de degradación de alrededor del 40 % para la condición de 30 °C y 60 % de HR (vida de estante) y que es superior al 60 % en la condición acelerada (Tablas 3 y 4 y Fig. 15 y 16). Existen diferencias significativas entre las variantes analizadas en comparación con la concentración de partenina en la muestra inicial, además se evidenciaron diferencias significativas al comparar las condiciones analizadas entre si (Anexo I).

Estos resultados ponen de manifiesto la insuficiente estabilidad química de la partenina en el sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn, en las condiciones de almacenamiento empleadas en este estudio, y la necesidad de evaluar alternativas que incluyan la vías para disminuir el porcentaje de humedad del sólido pulverulento y condiciones de almacenamiento que favorezcan la estabilización. Por otra parte, los resultados que se muestran en las tablas 3 y 4 muestran que la temperatura de



almacenamiento es uno de los factores que más acelera la degradación química de la partenina.

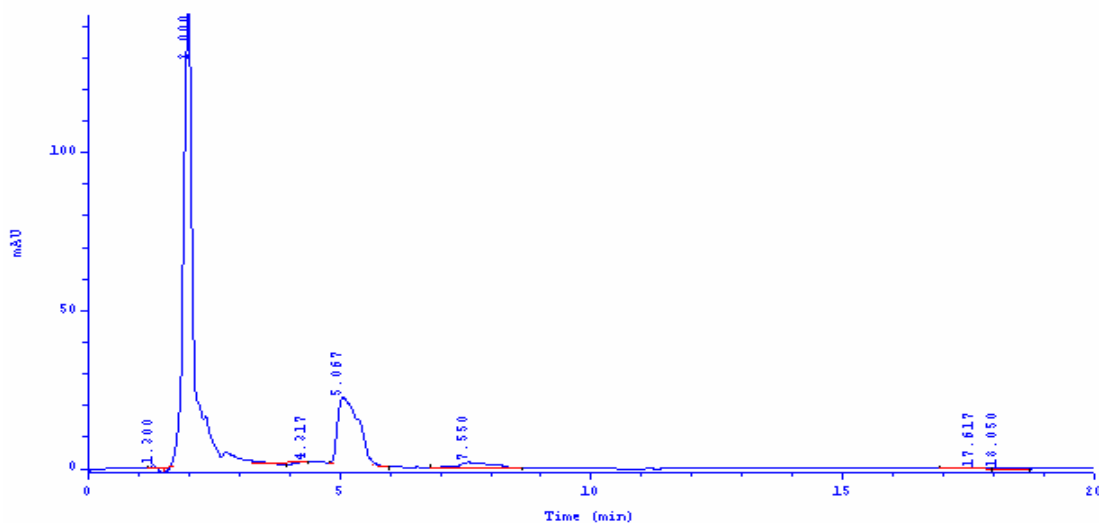


Fig. 15. Cromatograma HPLC obtenido para la muestra de análisis bajo condiciones acelerada.

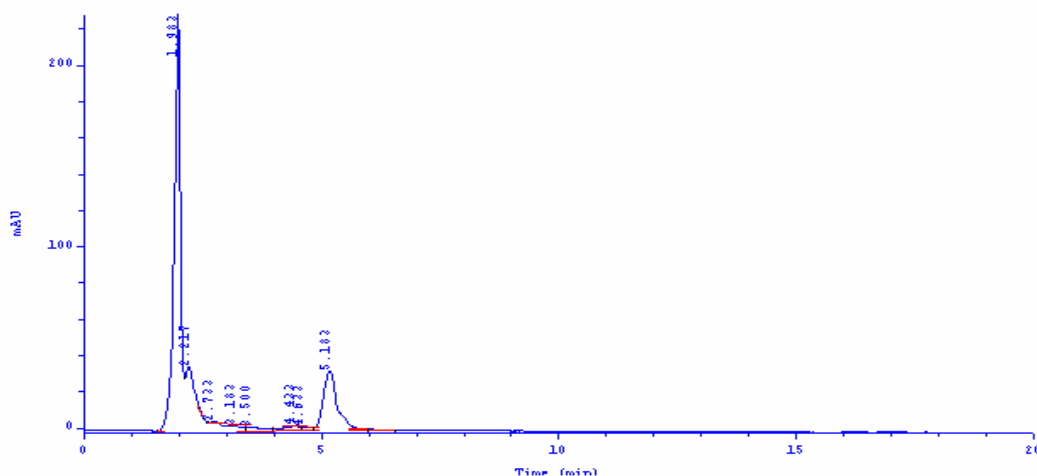


Fig. 16. Cromatograma HPLC obtenido para la muestra de análisis bajo condiciones de vida estante.



Conclusiones.

- ✚ La técnica analítica mediante HPLC es específica para la determinación de partenina en el sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn, bajo las condiciones de análisis establecidas y puede emplearse en estudios de estabilidad del mismo.
- ✚ La humedad constituye un factor que incide negativamente en la estabilidad química del ingrediente activo principal.
- ✚ La estabilidad química, en base a partenina, del sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn, conservado en frascos de vidrio ámbar cubiertos con papel de aluminio y tapón de goma es insuficiente con vistas a su comercialización como materia prima para la elaboración de formas de dosificación.



Recomendaciones

- ✚ Evaluar la influencia de la temperatura, como factor independiente, en la estabilidad química del sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn (escoba amarga) en base a partenina.

- ✚ Optimizar las condiciones de almacenamiento y el contenido de humedad residual del sólido pulverulento de *Parthenium hysterophorus*, Linn, con el objetivo de obtener una fecha de vencimiento razonable.



Bibliografía.

- 1) Roig, J. T. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Instituto del Libro. La Habana. Editorial Ciencia y Técnica: 354-356, 1974.
- 2) <http://www.danac.org.ve/indice/malezas>.
- 3) <http://www.emiokan.com/revista/editor.htm>.
- 4) <http://www.sld.cu/fitomed>.
- 5) <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/>.
- 6) B, Gil; R, Castillo; L, Mata: Extracto acuso de escoba amarga Estudio Preliminar de sus Propiedades. Rev Cubana Plant Med; 5(3):123-24, 2000
- 7) House, et AL. “Plantas medicinales comunes de Honduras. “*Parthenium hysterophorus linn*”: 319; 1995.
- 8) Piazzano, M; Bernardello, G; Novara, L; Hadid, M: Evaluación de los límites específicos entre *parthenium hysterophorus linn* y Evidencias Morfológicas, Anatómicas, Cromosómicas y Fotoquímicas. Anales jardín botánico de Madrid, 56(1) 1998, 66 – 67.
- 9) Hernández, M: Evaluación tecnológica de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus Linn*, tesis de diploma, UCLV, 2006



- 10) Gupta, R.: Chemical investigación of *Parthenium hysterophorus*, L. Indian Journal Pharm., vol. 39: 64-66, Indian, 1977.
- 11) Gary, O. y Plasencia, V: Tesis “Evaluación fotoquímica y biológica de los extractos de las hojas de *Parthenium hysterophorus* L.”, 1998.
- 12) Pólin, L: Aislamiento, Caracterización y Determinación cuantitativa de la Partenina en los sólidos pulverulentos del *Parthenium hystrophorus* L, Tesis de diploma, UCLV, 2006.
- 13) [http// www.senasica.gob.mx/solicitudesogms/consulta10/45](http://www.senasica.gob.mx/solicitudesogms/consulta10/45).
- 14) Facultad de química farmacéutica / Universidad de Antioquia agosto de 2001/ Sesquiterpenlactonas, 8-9-16.
- 15) From DNP on CD-ROM, Version 14.1. Copyright © 1982-2006 Chapman & Hall/CRC.
- 16) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data. 3rd Completely Revised and Enlarged English Edition., Springer-Verlag, Berlin, 2000.
- 17) Srivastava 1985. Effect of *Parthenium hystrophorus* L. extract on the seed germination and seedling growth of barley, pea and wheat. *Acta Botánica Indica* 13: 194-197.
- 18) Romo de Vivar. Productos naturales de la flora mexicana, 1975.



- 19) <http://www.microjuris.com/MJCH/jurispro>.
- 20) Merfort, I “Application of high- Performance liquid chromatography for analysis and isolation of sesquiterpene lactones” En : Journal of cromatography 265(1983)97-104\ Elsevier science publishers B.V , Amesterdam.
- 21) <http://www.fda.gov/ciber/guidances.htm>.
- 22) <http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos>.
- 23) Center for drug evaluation and research (CDER): “Validation of chromatographic methods”. Reviewer Guidance; p. 5-10, 1994.
- 24) Peña, C; Espinosa, V: Validación de los métodos analíticos para el control de calidad y el estudio de estabilidad del colirio de Idoxiuridina 0,1 %. Rev. Cubana Farm vol.39 no.2 ciudad de la Habana May-Aug. 2005
- 25) <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php>).
- 26) Marco, M: Contribución al estudio químico farmacéutico de las hojas de la especie *Tamarindos Indica L.*, Tesis de doctorado, Universidad de la Habana ,2005.
- 27) Carril, M; Mena, D; Espinosa, V: Validación de los métodos analíticos para el control de la calidad y estudio de estabilidad del salbutamol 0,5% en solución nebulizadora Rev Cubana Farm vol.39 no.2 ciudad de la Habana May-Aug. 2005
- 28) Vila Jato, J. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas, volumen 1: 317-346



- 29) <http://www.cimed.ideay.net.ni>
- 30) <http://www.fcq.unc.edu.ar/cime/publicaciones.htm>
- 31) Carranza, H; Corominas, H; Bachiller, M .Tratado de farmacia galenica. S.A de ediciones. Madrid.1993. Capítulo 4. 59-60
- 32) Center for drug evaluation and research (CDER): “Validación of chromatographic methods”. Reviewer Guidance; p. 5-10, 1994
- 33) http://www.colegiofarmaceutico.cl/revista/Pharmakon_mayo_2004.pdf
- 34) Torres.A.L: Estabilidad de Medicamentos. Conceptos fundamentales y causas de inestabilidad. Universidad Complutense de Madrid: 1-8; 1995.
- 35) <http://www.fda.gov/ciber/guidances.htm>
- 36) <http://www.comex.go.cr/acuerdos/comerciales/centroamerica.pdf>.
- 37) <http://www.gob.mx/unidades/comeri/html/normateca/normateca.htm>.
- 38) <http://www.saboriocoto.com>.
- 39) http://www.cecmed.sld.cu/Docs/RegFarm/DRA/LicProd/2001-2002/Res/Res_BRPS-20-01.pdf.
- 40) <http://www.asamblea.gob.ni>.



41) <http://www.quiminet.com.mx/art/industrias>.

42) USP \ United states pharmacopoeie 26_ Nacional formulary 21

43) Thomas, J: Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la evaluación de la partenina de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus* L. y para el control de su calidad. Trabajo de diploma \ UCLV; 2006.

✚ Nota : las paginas Web y los sitios del Internet fueron consultados entre febrero y abril del 2007



Anexo I

Tratamientos estadísticos

- ✚ Comparación entre las muestras almacenadas en condición $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ HR en frascos protegidos de la luz tapados y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad del Producto	3	.359167	.0165458	.0095527

One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad del Producto	-65.367	2	.000	-.6244333	-.665535	-.583331

- ✚ Comparación entre las muestras almacenadas en condición $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\%$ HR en frascos protegidos de la luz tapados y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad del Producto	3	.584267	.0084506	.0048790



One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad del Producto	-81.848	2	.000	-.3993333	-.420326	-.378341

✚ Comparación entre las muestras almacenadas en condición $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/80\% \pm 5\%$ HR en frascos protegidos de la luz destapados y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad del Producto	3	.728233	.0113500	.0065529

One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad del Producto	-38.970	2	.001	-.2553667	-.283562	-.227172

✚ Comparación entre las muestras almacenadas en las diferentes condiciones entre si mismas en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

ANOVA

Estabilidad del Producto

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.208	2	.104	656.983	.000
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.209	8			



Estabilidad del Producto

Condiciones de Trabajo		N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan ^a	A	3	.359167		
	B	3		.584267	
	C	3			.728233
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Scheffe ^a	A	3	.359167		
	B	3		.584267	
	C	3			.728233
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

- ✚ Comparación entre la muestra sometida a condición degradativa en medio básica y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad Medio Degenerativos	3	.019570	.0084436	.0048749

One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad Medio Degenerativos	-197.752	2	.000	-.9640300	-.985005	-.943055



- ✚ Comparación entre la muestra sometida a condición degradativa en medio oxidante y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad Medio Degenerativos	3	.041307	.0111718	.0064500

One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad Medio Degenerativos	-146.092	2	.000	-.9422933	-.970046	-.914541

- ✚ Comparación entre la muestra sometida a condición degradativa en medio acida y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad Medio Degenerativos	3	.152233	.0095553	.0055167

One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad Medio Degenerativos	-150.699	2	.000	-.8313667	-.855103	-.807630



- ✚ Comparación entre la muestra sometida bajo el efecto de la luz artificial degradativa y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad Medio Degenerativos	3	.451100	.0171126	.0098799

One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad Medio Degenerativos	-53.897	2	.000	-.5325000	-.575010	-.489990

- ✚ Comparación entre la muestra sometida bajo el efecto de la luz natural degradativa y la muestra inicial a tiempo cero en cuanto a la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Estabilidad Medio Degenerativos	3	.959200	.0262947	.0151812

One-Sample Test

	Test Value = 0.9836					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Estabilidad Medio Degenerativos	-1.607	2	.249	-.0244000	-.089720	.040920



- ✚ Comparación entre las muestras sometidas a las diferentes condiciones degradativas entre si misma cuanto la concentración (%) del principal ingrediente activo (partenina)

ANOVA

Estabilidad Medio Degenerativos

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.865	4	.466	1833.420	.000
Within Groups	.003	10	.000		
Total	1.868	14			

Estabilidad Medio Degenerativos

Medios degradativos		N	Subset for alpha = .05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	A	3	.019570			
	B	3	.041307			
	C	3		.152233		
	D	3			.451100	
	E	3				.959200
	Sig.		.126	1.000	1.000	1.000
Scheffe ^a	A	3	.019570			
	B	3	.041307			
	C	3		.152233		
	D	3			.451100	
	E	3				.959200
	Sig.		.611	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Report

Estabilidad Medio Degenerativos

Medios degradativos	Mean	N	Std. Deviation
A	.019570	3	.0084436
B	.041307	3	.0111718
C	.152233	3	.0095553
D	.451100	3	.0171126
E	.959200	3	.0262947
Total	.324682	15	.3652521