



*Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
Facultad de Química-Farmacia.
Departamento de Farmacia.*

*"Desarrollo y validación de un método analítico,
mediante la cromatografía de gases, para evaluar la
estabilidad del jarabe al 10% de Plectranthus
amboinicus (Lour.) Spreng".*

*Tesis presentada en opción al título académico de Máster en
Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural.*

Autor: Lic. Bertha María Real Sánchez

Tutores: Dr. C. Luis R. Bravo Sánchez

Dra. C. Mirtha Mayra González Bedia

*Santa Clara
2013*

Dedicatorias

A los que tanto honro, porque su amor me inspira: Mi padres

A los dueños distinguidos de todos mis esfuerzos: Mis dos hijos

A mi esposo por su apoyo y comprensión.

Agradecimientos:

Por haber contribuido al desarrollo de este trabajo:

A mis tutores: Dr.C. Luis R. Bravo Sánchez y

Dra.C. Mirtha Mayra González Bedia.

RESUMEN

Se desarrolló una técnica analítica para la cuantificación simultánea de timol y carvacrol en el jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, con el empleo de una fase estacionaria de baja polaridad: polidimetilsiloxano de 1 µm de espesor, recubriendo internamente un capilar de sílice fundida de 30 m de longitud y 0,53 mm de diámetro interno, con el empleo de nitrógeno como gas portador y como sistema de detección ionización por llama. Se utilizó el modo de operación de temperatura programada, el cual permitió separar eficazmente los metabolitos de interés del resto de los componentes del jarabe. Bajo las condiciones de análisis, las concentraciones de timol y carvacrol en el jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng fueron de 54,98 mg/mL y 184,42 mg/mL, respectivamente.

El método desarrollado fue validado y resultó fiable, según las normativas vigentes, y podrá ser empleado como método de control y para evaluar la estabilidad del jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Teniendo en cuenta el estudio de estabilidad por el método de vida de estante, no se recomienda utilizar pasados tres meses de su elaboración.

INDICE.

INTRODUCCIÓN.....	1
DESARROLLO.....	3
Capítulo 1. Revisión Bibliográfica.....	3
1.1.1 Orígenes de la Medicina Natural.....	5
1.1.2 La Medicina Natural en Cuba.....	8
1.2 Consideraciones generales del <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng (Orégano francés).....	10
1.2.1 Composición Química.....	10
1.2.2 Principales usos farmacológicos reportados en la literatura.....	12
1.2.3 Farmacología preclínica.....	14
1.2.4 Toxicidad:.....	15
1.3 Consideraciones generales de estabilidad.....	15
1.3.1 Métodos analíticos aplicados al desarrollo de medicamentos herbarios.....	16
1.4 Aspectos generales sobre la validación de técnicas analíticas.....	17
1.5 Consideraciones generales de jarabes.....	20
1.5.1 Problemas a considerar en este tipo de formulación: Estabilidad.....	21
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	23
2.1 Materiales, reactivos, disolventes, equipos e instrumentos de medición.....	23
2.1.1. Reactivos y disolventes.....	23
2.1.2 Equipos e instrumentos de medición.....	23
2.2 Método de cromatografía de gases para la determinación simultánea de timol y carvacrol en los jarabes al 10 % de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng elaborados en el CPL de Placetas, Villa Clara.....	24
2.3 Validación del método de cromatografía de gases para la determinación simultánea de timol y carvacrol en el jarabe al 10 % de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.....	24
2.4 Estudio de estabilidad de estante del jarabe al 10 % de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.....	25
Capítulo 3. Resultados y Discusión.....	26
3.1 Determinación simultánea de timol y carvacrol en los jarabes al 10 % de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng elaborados en el CPL de Placetas, Villa Clara mediante la cromatografía de gases.....	26
3.2. Validación del método analítico para el control y la evaluación de la estabilidad del jarabe al 10 % de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.....	28
4.3 Estudio de estabilidad de estante del jarabe al 10 % de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.....	34
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39

INTRODUCCIÓN.

La medicina natural se define como la práctica terapéutica que pretende conseguir el alivio o curación de las enfermedades por medio de los productos provenientes directamente de la naturaleza, sin síntesis y con escasa o nula manipulación. La medicina natural utiliza, principalmente, productos vegetales, animales y minerales, los cuales, bien usados directamente o mediante preparación previa, en uso tópico o por ingestión, permiten suministrar al organismo sustancias útiles en el tratamiento de las enfermedades.

De modo que las plantas representan una extraordinaria fuente de nuevos compuestos con actividad terapéutica; de ahí el creciente interés del estudio de las mismas.

En la Empresa Provincial de Farmacias y Ópticas de Villa Clara, se cuenta con un total de 14 Centros de Producción Local (CPL), donde se elaboran varios medicamentos de origen natural, por ejemplo: El *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng en la forma farmacéutica de jarabe al 10%, que tiene como efecto terapéutico: anticatarral y expectorante. Este producto tiene una amplia demanda por la población debido al alza de las enfermedades respiratorias en el país, por lo que constituye un reto hoy día elaborar un medicamento, en este caso un jarabe que sea estable, con acción farmacológica sobre las vías respiratorias.

Los jarabes son disoluciones acuosas con alta concentración de azúcares, de consistencia viscosa, en las que se encuentra el o los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) y aditivos. En general, los IFA son menos estables en disolución que en el estado sólido. No obstante, las formas de dosificación en las que el IFA está en disolución son la forma de elección en numerosas ocasiones y la estabilización se logra mediante diferentes métodos.

El conocimiento científico alcanzado por la Industria Médico – Farmacéutica y Biotecnológica ha generado el desarrollo de los Laboratorios de Control de Medicamentos y de los métodos de ensayo en función del incremento de los estándares de Calidad de los productos farmacéuticos, requisito indispensable para el registro de un medicamento.

La validación de los métodos analíticos utilizados en actividades de control desempeñan un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de Calidad de los medicamentos de uso humano, lo cual constituye notablemente al aseguramiento de la Calidad, Seguridad y Eficacia de los mismos.

La supervisión de la Calidad de drogas herbarias, productos intermedios y productos finales se realiza mediante análisis químico. Se describen métodos validados

desarrollados para las drogas herbarias específicas en las monografías pertinentes en Farmacopeas. Estos normalmente pueden modificarse para incluir un análisis del producto intermedio y del producto medicinal herbario derivado de la droga, sin embargo, la mayoría de sustancias herbarias usadas en la fabricación de medicamentos no solo se les describe en una monografía de una Farmacopea, sino se tienen que desarrollar métodos específicos de análisis para supervisar la calidad del producto. En los Centros de Producción Local se le realizan controles de Calidad a los jarabes, según lo establecido en los documentos técnicos normativos vigentes.

En la actualidad los productos que se obtienen en los CPL no poseen estudios de estabilidad que justifiquen su período de validez, y de hecho se les asigna un mes si no se le incorpora preservante a la formulación, en cuyo caso se asumen seis meses como período de vida útil. Se impone realizar investigaciones racionales que aporten resultados confiables sobre la estabilidad de estas formas de dosificación.

En consecuencia, se ha identificado como **problema científico**: La no existencia de estudios confiables, que avalen la validez del período de vida útil del jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, que se elabora en los CPL en la Provincia de Villa Clara.

Sobre esta base se formuló la siguiente **hipótesis**: Es posible desarrollar estudios que permitan conocer el período de vida útil del jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, que se elabora en los CPL en la Provincia de Villa Clara, a través del método de vida de estante, en los que se empleen técnicas analíticas validadas con este fin.

Los objetivos de este trabajo son:

Objetivo General:

Desarrollar y validar un método analítico para el control de la calidad y el estudio de estabilidad del jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, que se elabora en los CPL en la Provincia de Villa Clara.

Objetivos Específicos:

Desarrollar y validar un método de cromatografía de gases para utilizarlo en control de calidad y estudios de estabilidad del jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Determinar la estabilidad física y química del jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng por el método de vida de estante.

DESARROLLO.

Capítulo 1. Revisión Bibliográfica.

1.1 Consideraciones generales sobre la medicina natural.

La **medicina natural** se define como la práctica terapéutica que pretende conseguir el alivio o curación de las enfermedades por medio de los productos provenientes directamente de la naturaleza, sin síntesis y con escasa o nula manipulación. (Arteche, 2000).

Es una medicina sencilla, menos cara para la sociedad que promueve la autonomía del paciente, educándole para resolver sus propios problemas de salud con la ayuda del médico pero sin depender de él. En el mundo de la medicina natural se hace referencia en las bibliografías a diferentes denominaciones conceptuales, el conocimiento preciso y exacto de las mismas facilitan el trabajo en esta disciplina, de ahí que en este trabajo se haga mención a las que se consideran más afín al trabajo de diploma que nos ocupa:

- ❖ **Droga vegetal:** Plantas (se incluyen también los talofitos, especialmente líquenes, hongos superiores y algas) o sus partes, las cuales son usadas para propósitos médicos o farmacéuticos. Las drogas vegetales son consideradas como sustancias activas, se conozcan o no sus constituyentes con actividad terapéutica.
- ❖ Otra definición empleada en medicina natural es la referida a **Medicamento de Origen Natural** es aquel medicamento cuya sustancia activa o fármaco se obtiene directamente o mediante procedimientos específicos, de tejidos animales, vegetales, minerales o de organismos microbianos y que tienen un uso justificado por la práctica de la medicina tradicional o bien por estudios científicos. Cuando el material de origen natural se combina con sustancias activas químicamente definidas, no se considera medicamento natural.
- ❖ **Medicamento Tradicional:** Medicamento compuesto de sustancias naturales que, por regla general, se preparan empíricamente y se producen por métodos que no se ajustan a las normas farmacéuticas modernas. Generalmente esos medicamentos se administran a partir de supuestos basados en hallazgos empíricos muy antiguos y en la práctica de médicos tradicionales, chamanes, curanderos, brujos y otras personas que no poseen las calificaciones exigidas por la medicina occidental moderna. Los medicamentos tradicionales deben ser

objeto de las mismas evaluaciones que los modernos a fin de garantizar una oferta de medicamentos eficaces y seguros. Estas evaluaciones deben incluir las pruebas de eficacia, seguridad y otras.

- ❖ **Medicamento Herbario:** Producto medicinal acabado y etiquetado cuyas sustancias activas están formados por partes aéreas o subterráneas de las plantas, o sus combinaciones, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales, que se utiliza con fines terapéuticos comprobados por estudios científicos. Puede contener excipientes además de las sustancias activas. Cuando el material vegetal se combina con sustancias activas químicamente definidas (aún cuando fuesen constituyentes aislados de plantas) no se considera medicamento herbario.
- ❖ **Medicamento Herbario Tradicional:** Producto medicinal acabado y etiquetado cuyas sustancias activas derivan de plantas y/o sus mezclas en forma de extractos, tinturas, aceites grasos o esenciales, jugos, crudos, drogas secas y otras preparaciones que tienen una forma farmacéutica definida y un uso justificado por informaciones etnomédicas y de utilización, documentaciones tecnocientíficas o publicaciones indexadas. Se emplean por vía oral o tópica u otra vía no parenteral, en el tratamiento de síntomas o enfermedades leves. Cuando el material vegetal se combina con sustancias activas químicamente definidas (aún cuando fuesen constituyentes aislados de plantas) no se considera medicamento herbario tradicional.
- ❖ **Preparado vegetal:** Droga vegetal molida o pulverizada, extractos, tinturas, aceites grasos o esenciales, jugos, bálsamos, gomas o resinas procesadas, látex, etc., preparados a partir de drogas vegetales y preparaciones cuyas producciones involucran procesos de concentración, fraccionamiento y purificación. Los constituyentes aislados de las drogas vegetales o sus mezclas, químicamente definidos, no se consideran preparados vegetales. También pueden formar parte de los preparados otros componentes tales como solventes, diluentes y preservativos. (Fuentes & Granda, 1997)

Se conocen más de 3000 plantas medicinales, pero el número de vegetales en la naturaleza es mucho mayor, por lo que las posibilidades reales son inmensamente superiores a las conocidas. De modo que las plantas representan una extraordinaria fuente de nuevos compuestos con actividad terapéutica; de ahí el creciente interés del estudio de las mismas.

1.1.1 Orígenes de la Medicina Natural.

En el siglo XI, surge la primera Escuela de Medicina en Italia y se generaliza el uso de plantas medicinales. A finales del Siglo XV y en el Siglo XVI se llevó a cabo el descubrimiento y colonización de América y de su rica flora, - diferente en gran medida al resto del mundo- así como de la vasta experiencia de sus habitantes en la Fitoterapia, lo que constituyó un acontecimiento. Es digno destacar los aportes hechos por hombres de ciencia, monjes e indígenas cultos que participaron en este proceso y conocieron e investigaron la impresionante flora y experiencias de los nativos, particularmente en México, incrementándose los conocimientos de Fitoterapia y legando a la posteridad diferentes documentos y libros que hoy son parte de la Historia de la Medicina Universal. A partir de la década del 60 del pasado siglo, existe un movimiento de rescate de la Fitoterapia y la Medicina Tradicional a nivel mundial, esta tendencia mundial ha sido dirigida desde 1975 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y es apoyada por diversos organismos internacionales como la Organización de Naciones Unidas (ONU), la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI) y otras organizaciones no gubernamentales, que preparan un Código Internacional contentivo del listado de Plantas Medicinales de diferentes regiones del mundo con el fin de unificar criterios acerca del uso de plantas pero sobre bases científicas en el "Nuevo Estilo de la Fitoterapia" y estableciendo prioridades de investigación y uso. Es muy afortunado este renacer de las Plantas Medicinales pues resulta contradictorio que siendo éstas usadas por el hombre desde su surgimiento mismo, son menos conocidas y estudiadas que los Quimioterápicos de Síntesis, que han surgido en los últimos 200 años y fundamentalmente en la 2da. mitad de este siglo. El "Nuevo Estilo de la Fitoterapia" pretende que las Plantas Medicinales y Medicamentos Herbarios se estudien con el mismo rigor que los medicamentos de síntesis y se empleen con la misma categoría terapéutica de éstos. Es necesario señalar que según datos encontrados en la literatura, en Perú el 50% de los fármacos que se emplean son de plantas medicinales mientras que en Asia llegan al 80%. La importancia en la actualidad de la Medicina Natural se evidencia por el alto consumo de los productos recomendados por esta alternativa para el manejo de las enfermedades. En los Estados Unidos un estudio mostró un aumento significativo de los tratamientos médicos alternativos, pasando de un 33.8% en 1990 a un 42.1% en 1997. El aumento más dramático en ese mismo país se dio con el uso de

las hierbas medicinales, cuya utilización pasó de 2.5% en 1990 a un 12.1% en 1997, un aumento de un 380%. Otro dato encontrado revela que dentro del 44% de los adultos que reportó el uso regular de medicamentos prescritos por el médico, se encontró que el 18.4% también utilizaba, al menos, un producto de la medicina herbaria. En Inglaterra, un sondeo efectuado por una organización de 28.000 consumidores descubrió que 80 personas de cada 100 habían recurrido a alguna forma de medicina complementaria. Por otra parte las consultas con médicos homeópatas está aumentando a un ritmo de un 39 por ciento al año y el 42 por ciento de médicos entrevistados, según el British Medical Journal, remitían sus pacientes a médicos homeópatas. En Francia aproximadamente 11.000 médicos y 20.000 farmacias ofrecen tratamiento homeopático y el 25 por ciento de la población recurre a esta medicina. En Estados Unidos se incrementaron las ventas de medicamentos homeopáticos en 1.000 por ciento entre finales de los años setenta y principio de los ochenta y una investigación publicada por el Western Journal of Medicine reveló que los pacientes homeopáticos están mejor educados que el estadounidense promedio.(Alvarado, 2000)

Las razones que motivan este enorme auge de las medicinas alternativas son varias:

- Abordaje integral de la persona
- Mejores y más rápidos resultados en ciertos tipos de enfermedades y padecimientos
- Único tratamiento disponible en algunos trastornos ya que la Medicina convencional sólo ofrece en esos casos un tratamiento para los síntomas.
- Menos complicaciones y menos efectos secundarios
- Algunos tratamientos son menos traumáticos.
- Por lo general son de más bajo costo.

Es importante conocer entonces: ¿qué es lo que se entiende en la actualidad como plantas medicinales y qué condiciones han de cumplir para que sean consideradas como medicamentos? En lo que se refiere a la primera parte de la pregunta, la planta medicinal es definida por los expertos de la OMS como toda especie vegetal en la que el todo o una parte de la misma está dotada de actividad farmacológica (OMS, 1998 y 2002). Las plantas medicinales así definidas pueden incluirse en una de las dos categorías siguientes:

- Aquellas que están destinadas en forma exclusiva a la obtención de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) con actividad farmacológica.

- Plantas o partes de las mismas a utilizar como tales o bajo la forma de alguno de los distintos tipos de extractos que se pueden obtener a partir de ellas. Esta segunda categoría es la entendida de modo amplio como planta de uso medicinal, debiéndose cumplir con los requisitos inexcusables en todo medicamento en cuanto a calidad, seguridad y eficacia.

La calidad de cualquier producto medicamentoso, como es el caso de los fitopreparados (medicamento herbario), se encuentra definida por el cumplimiento de sus especificaciones analíticas descritas en las correspondientes farmacopeas y otras normativas específicas emanadas de las instituciones correspondientes en cada país (Farmacopea Británica, 2004; Farmacopea Europea, 2005; Farmacopea de los Estados Unidos, 2007). En el caso de las plantas medicinales, el principal índice analítico es el relativo al contenido de IFA con actividad farmacológica y son las técnicas cromatográficas (cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficacia), las que permiten establecer el perfil químico o huella dactilar de la especie vegetal, así como su cuantificación con una adecuada sensibilidad y especificidad (Vlietinck, 2004; Braithwaite, 2004).

La seguridad de los preparados fitoterapéuticos, basada en las investigaciones farmacológicas realizadas sobre los mismos, relativas tanto a su actividad farmacológica como a sus posibles efectos tóxicos y en la ausencia en el material vegetal de contaminantes de todo tipo, se ha visto altamente favorecida por la incorporación al estudio de las plantas medicinales de las últimas técnicas, tanto en el campo farmacológico como en el analítico.

Existen diferentes estudios que deben realizarse para desarrollar y utilizar nuevos medicamentos (sean de origen natural o sintéticos) en humanos. En relación con los productos herbarios, la ruta crítica para su evaluación esta bien definida y ha sido publicada (Fomulario Nacional, 2010; Mitchell, 2006). No hay duda de que las exigencias no son las mismas si se compara la introducción de una nueva molécula sintetizada, y a la cual el hombre nunca se ha expuesto, con una planta medicinal usada tradicionalmente durante siglos por generaciones y generaciones y en diferentes regiones, esto constituye un aval de seguridad y efectividad pero no se debe limitar a él, ya que cada parte de una planta tiene numerosas sustancias con actividad biológica y con capacidad potencial de producir efectos indeseables que pueden pasar inadvertidos fuera de una investigación adecuadamente diseñada.

A partir de la década de los noventa hay un resurgir de la Medicina Natural en nuestro país.

1.1.2 La Medicina Natural en Cuba.

En Cuba la medicina tradicional que llega a nuestros días, no tiene como fuente fundamental la aborigen, porque su población fue exterminada; nos llega la desarrollada a partir del siglo XV por españoles y más tarde por africanos, chinos y yucatecos. Hay crónicas donde se registra el uso de plantas medicinales por nuestros mambises durante las guerras de independencia. La investigación acerca del uso de plantas medicinales es destacada. En la década del 40, por la obra del sabio cubano doctor Juan Tomás Roig, botánico, farmacéutico y agrónomo, quien identificó 595 especies que eran empleadas por la población cubana para diferentes usos curativos y en el prólogo de su libro *Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba*, hizo un llamado a la Comunidad Científica Nacional para que se estudien dichas plantas con el objetivo de verificar sus actividades farmacológicas. También señaló la posibilidad de desarrollar una industria farmacéutica nacional a partir de nuestra flora. En los años 60 comienza un desarrollo ascendente de la investigación científica sobre las plantas medicinales, pero más bien con fines académicos y de forma aislada por distintos investigadores. En la década del 70 se inaugura la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Juan Tomás Roig," con el objetivo de iniciar el estudio integral de las plantas medicinales en Cuba, pero no fue hasta la década del 80 que comenzó un trabajo de rescate de la medicina tradicional, al evaluar estratégicamente las potencialidades existentes, en especial con las plantas medicinales, tomando en consideración las recomendaciones de la OMS (Zhang, 1996) y, por supuesto, los antecedentes que existían en la isla. "En 1991 se aprobó un programa de gobierno en el cual están involucrados distintos organismos centrales del estado como: Ministerio de Salud Pública, Ministerio de la Agricultura, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (antigua ACC), Ministerio de Educación Superior, Ministerio de las Fuerzas Armadas, Ministerio del Interior y Consejo de Estado, que específicamente contempló:

1. Plan de Investigaciones de Plantas Medicinales.
2. Sistema informativo FITOMED y base de datos computadorizada.
3. Programa de capacitación de profesionales y técnicos medios.
4. Programa de Divulgación Popular.
5. Elaboración de normas ramales.
6. Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos
7. Normas de Especialidades Médicas para el uso de fitofármacos y apifármacos.

El Centro Nacional de Promoción y Educación para la Salud se ha trazado una

estrategia para la divulgación popular de la medicina tradicional y natural, a partir de las responsabilidades individual y colectiva en la protección de la salud, con el objetivo de lograr que la población cubana utilice racionalmente las plantas medicinales, que conozca los beneficios y los perjuicios que su empleo implica y recomendar aquéllas con resultados acreditados científicamente” (Soler, 1997).

En los años 90, después de la desaparición del campo socialista, de donde provenían la mayor parte de los insumos y materias primas, muy poco se diferenciaba del estado de guerra, concebido muchos años antes, es por ello que el MINFAR es la institución que orienta en ese momento la implantación de los nuevos métodos para producir medicamentos.

La coordinación entre el MINSAP y el MINAGRI condujo a la legalización de las plantas que a partir de ese momento formarían parte del sistema nacional de salud pública. A tal efecto se creó en 1990 el Departamento de Plantas Medicinales del MINAGRI que se responsabilizó con la producción en especies y volúmenes.

Los estudios sobre la flora medicinal fueron reproducidos en diferentes provincias del país teniendo en cuenta las propiedades curativas que popularmente se le adjudicaban. Al final se escogieron unas 30 especies para el tratamiento de las enfermedades más comunes. El uso de ellas se ha evaluado internamente en Cuba y comparado con el uso medicinal reportado en otros países, antes de ser recomendadas.

Para la preparación de estos medicamentos existen Centros de Producción, en cada territorio, donde se recibe la droga seca y el resto de las materias primas (alcohol natural, azúcar de caña, etc.), los que cuentan con los medios para realizar las extracciones tanto en forma de tintura como de extracto fluido. Los extractos pueden consumirse directamente o servir de base para la preparación de jarabes, elíxires, pomadas o cremas.

En la actualidad se observa un marcado interés en los estudios farmacológicos, toxicológicos y genotóxicos de las plantas medicinales para obtener un basamento científico de su acción terapéutica y del posible efecto toxicológico y toxicogenético sin abandonar su empleo tradicional tan enraizado en la población, que ofrece así grandes posibilidades de emplearlas como medicamento herbario o en la búsqueda de nuevos IFA (Dewick, 2002; Rick, 2009).

Entre las plantas mas utilizadas en nuestro país para la elaboración de productos naturales se encuentra el *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano francés)

1.2 Consideraciones generales del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano francés).

El *orégano francés*, *orégano*, *orégano de la tierra* es el nombre vulgar con que es conocida esta especie, pero universalmente es conocida como *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, nombre que brinda la nomenclatura binaria establecida por Carlos Linneo en 1753 (Fuentes & Granda, 1997).

Todas las especies de plantas tienen una ubicación taxonómica, esta se ubica en el Reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliosida, orden Lamiales, familia Lamiaceae, género *Coleus*, especie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Se describe como una hierba perenne, succulenta, de hojas anchamente ovadas, de bordes dentados, pecíolos gruesos y flores violáceas en espigas terminales con fuerte olor característico a orégano, de donde deriva su nombre común. La especie se considera nativa de las regiones tropicales de Asia Oriental y fue introducida en Cuba, otras Antillas y algunos países de América Continental; en Cuba se le cultiva con frecuencia en patios y jardines por las propiedades medicinales que la población le atribuye.

1.2.1 Composición Química.

La evaluación fisicoquímica del aceite esencial de esta especie arrojó altos porcentajes en las hojas (hasta 0,9 y 1,0) e identificó como componente principal al timol y el carvacrol los cuales se consideran responsables de su acción antimicrobiana. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. Las figuras 1 y 2 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano.

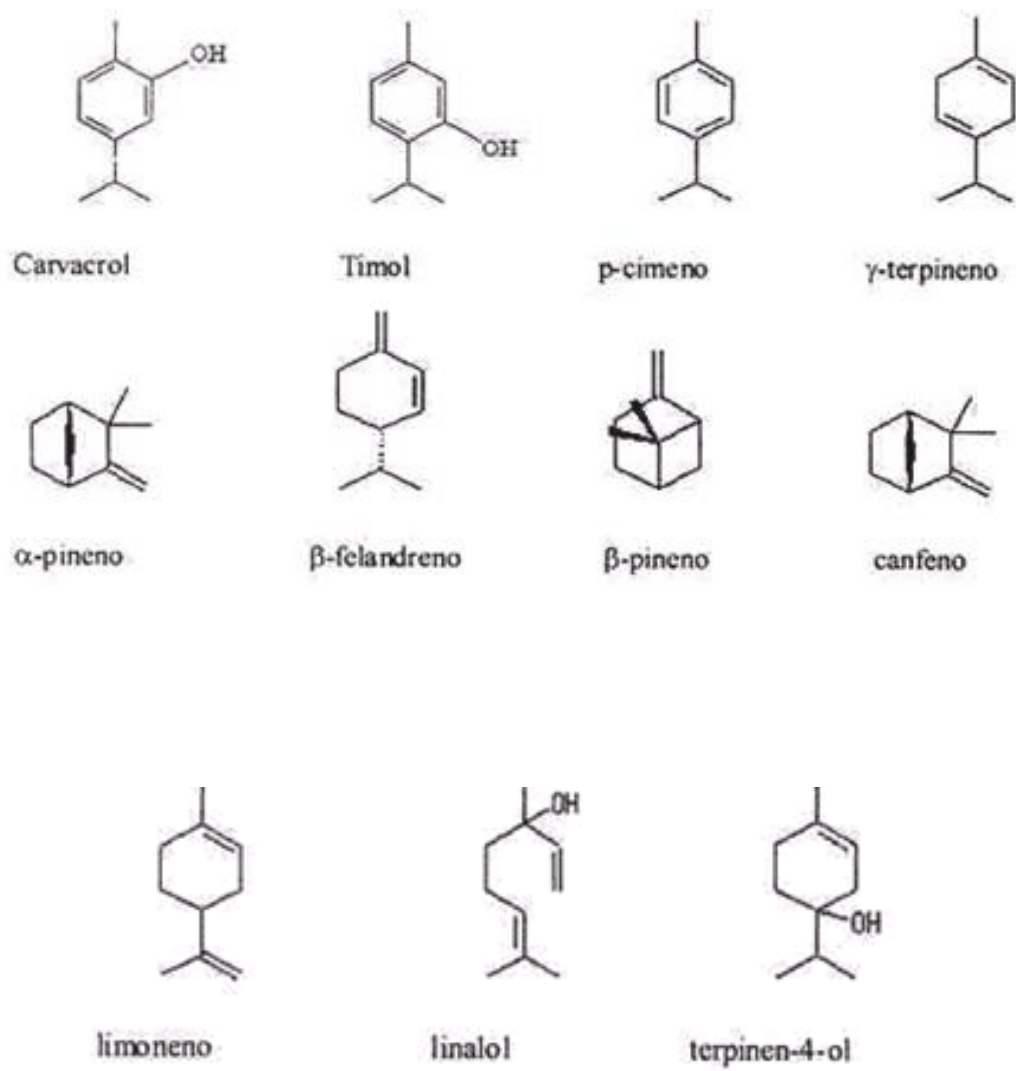
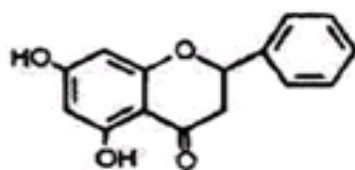
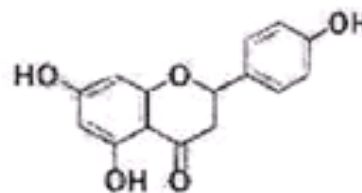


Figura 1. Estructura química de los principales componentes del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.



Pinocembrina



Naringenina

Figura 2. Estructura química de los principales flavonoides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

En el estudio referido principalmente al **timol** (2-isopropil-5-metilfenol) se plantea es una sustancia cristalina incolora con un olor característico que está presente en la naturaleza en los aceites esenciales del tomillo o del orégano. El timol pertenece al grupo de los terpenos. Un isómero del timol es el carvacrol. Los datos fisicoquímicos referidos a este aceite esencial son los siguientes:

- Fórmula: $C_{10}H_{14}O$
- Masa molar: 150,22 g/mol
- Temperatura de fusión: 49 - 51 °C
- Temperatura de ebullición: 232 °C
- Punto de inflamación: 107 °C
- Tensión de vapor: 2,5 hPa a 25 °C
- Densidad: 0,97 g/mL (20 °C); 0,93 g/L (70 °C)
- Solubilidad: 0,98 g/L en agua a 25 °C; 1,000 g/L etanol; 1,428 g/L cloroformo
- LD₅₀: 980 mg/kg

1.2.2 Principales usos farmacológicos reportados en la literatura.

Uso tradicional.

En la medicina tradicional se emplea la decocción de las hojas frescas como broncodilatador, expectorante en ronqueras y catarros en general; como digestivo; en dolores de oídos se utilizan las hojas salteadas en aceite. En la India el jugo de las hojas tiene propiedades específicas contra el cólera, y secadas a vapor y combinadas

con otras plantas medicinales, se administra por vía oral en el tratamiento de enfermedades digestivas y fiebres en niños. Se emplea como antiepiléptico en la Medicina Tradicional Vietmanita.

Las extracciones con agua caliente de las partes aéreas de la planta se utilizan en Asia en el tratamiento de asma, tos crónica, epilepsia y otras afecciones convulsivas siendo administrada por vía oral. En Tailandia el jugo de las hojas frescas se utiliza en el asma. En Cuba es muy utilizado como condimento, remedios caseros y con fines ornamentales.

Uso interno

- **Digestivo:** Especialmente en casos de espasmos intestinales. El timol, el carvacrol y el borneol, junto con el ácido cafeico son los componentes que fundamentalmente ejercen esta función. (Infusión de una cucharadita de sumidades florales en una taza de agua. Tres tazas al día, después de las principales comidas) Además de ayudar en las digestiones estomacales, los valores hepatoprotectores del ácido ursólico, sobre el cual se ha comprobado su actividad antitumoral, lo hacen muy adecuado en enfermedades del hígado.
- **Carminativo:** Para expulsar los gases intestinales. El timol y el carvacrol, además de ser antiespasmódicos, son también carminativos. (La infusión mencionada anteriormente puede servir para este menester).
- **Expectorante, antiinflamatorio, antiséptico y de las vías respiratorias:** Ante la aparición de dolencias respiratorias causadas por procesos infecciosos, como catarros, resfriado, bronquitis, etc. eliminando la tos, desinflamando los bronquios y ayudando en la eliminación de los gérmenes (5 gotas de esencia al día) (5 ml de extracto fluido) Las infusiones bien calientes de flores de esta planta ayudaran a reducir la fiebre. (Infusión de una cucharadita de flores secas por taza de agua. Dejar reposar media hora y tomar un par de tazas al día. Es importante cada vez tomarla caliente).
- **Emenagogo:** Rebaja ligeramente los dolores de la menstruación y facilita el vaciado, evitando los problemas colaterales que origina como dolores de cabeza, estómago, retención de líquidos e irritabilidad general. (Infusión de una cucharada de sumidades floríferas. 2 tazas diarias durante una semana anterior a la menstruación).
- **Antioxidante:** Es una de las plantas con más antioxidantes. Contiene más de 30 compuestos con estas propiedades, entre ellos el timol, muy abundante también en el tomillo, el ácido rosmarínico o el carvacrol. Estas propiedades pueden ser

muy útiles en el tratamiento de enfermedades como el Sida o el cáncer. (Infusión de una cucharada de té por taza de agua. Tomar tres tazas al día).

- **Aparato circulatorio:** Por su contenido en naringenina, un flavonoide con propiedades antiagregantes que favorece la circulación, y mejora el riego del cerebro, esta planta podría ayudar a mejorar la memoria. (Infusión de una cucharadita por taza de agua. Tomar dos tazas al día).

Uso externo

- **Vulnerario:** En uso externo los valores antisépticos y fungicidas mencionados anteriormente pueden aprovecharse para desinfectar heridas, pero al mismo tiempo sus propiedades analgésicas y cicatrizantes nos quitarán el dolor y ayudarán a recuperar las lesiones externas. (Aplicar aceite esencial sobre la parte de la piel afectada con una compresa limpia)
- **Reumatismo:** Resulta un buen remedio para los dolores e inflamaciones causadas en las articulaciones por las enfermedades reumáticas. (El tratamiento anterior. Resulta muy adecuado un baño con el agua de la bañera muy caliente, donde se haya vertido un par de litros de infusión de flores secas.)
- **Amigdalitis:** Igualmente podemos realizar gargarismos con la preparación anterior para combatir las anginas.

Cosmética:

Las industrias de productos de cosmética, así como las de perfumería utilizan su riqueza en aceites para la elaboración de perfumes, colonias, etc.

1.2.3 Farmacología preclínica.

El efecto antitusivo del extracto acuoso y del extracto fluido elaborado con Etanol al 30 %, comparable al de la codeína (20 mg/Kg) en el modelo experimental de aerosol de amoníaco en cobayos .

Por otra parte, Estudios farmacológicos realizados demuestran las propiedades antiepilépticas de la decocción de las hojas. Se demostró la actividad antimicrobiana in vitro de 2 extractos (fluido y acuoso) de la especie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng cosechado en Cuba. El extracto fluido presentó un amplio intervalo de actividad frente a los diferentes grupos microbianos estudiados (bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos levaduriformes y dermatofilos) siendo superior el extracto acuoso de dicha especie vegetal.

1.2.4 Toxicidad:

El aceite esencial se puede considerar como un narcótico. Al ingerirlo en dosis superiores a 5 gotas, o incluso inferiores en ciertos casos, puede producir somnolencia e incluso provocar el anestesiamiento, aunque los síntomas de una fase inicial pueden ser de euforia y excitación. En caso de embarazo su ingestión puede producir abortos. Por su contenido en fitatos, que previenen la absorción del hierro, no resulta adecuado para enfermos de anemia.

1.3 Consideraciones generales de estabilidad.

El conocimiento de las características de la planta de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng para la obtención de productos farmacéuticos es importante, además de ser necesario el desarrollo de pruebas que avalen su uso y estabilidad.

Se define a la estabilidad como la propiedad de cualquier forma farmacéutica o un principio activo para mantener las especificaciones señaladas y aceptadas en la monografía que aseguren sus características físicas, químicas, microbiológicas y biofarmacéuticas desde su preparación y durante todo el período de validez.

Puede ser definida, además, como la capacidad de una formulación particular, en un sistema envase-cierre específico de mantener sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas.

La estabilidad integral de un medicamento puede ser:

- Física.
- Química.
- Microbiológica.
- Toxicológica.
- Terapéutica

El objetivo de las pruebas de estabilidad “es proporcionar pruebas sobre la forma en que la calidad de un fármaco o medicamento varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores ambientales, como temperatura, humedad y luz, y establecer un período de prueba para la droga o sustancia, la vida útil para el producto y las condiciones de almacenamiento recomendadas”.(EMA, 2006), así como, lograr identificar las vías de degradación, tipo de cinética y productos de degradación. Basado en lo anteriormente expuesto se realizan los estudios analíticos de jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng..

Para compuestos químicamente definidos se puede monitorear la degradación de los compuestos activos y la aparición de productos de degradación, las posibles vías de

degradación y los factores que la afectan. Sin embargo, los productos de degradación son difíciles de separar, y las vías de degradación suelen ser mucho más complicadas debido a la influencia de los componentes que la acompañan que pueden actuar como catalizadores. Por ello, la selección de los métodos analíticos para los estudios de estabilidad es de mayor complejidad en estos productos con relación a los compuestos sintéticos.

Debe tenerse precaución en la selección del sistema envase cierre en el desarrollo de los estudios de estabilidad (Pingale, 2008).

1.3.1 Métodos analíticos aplicados al desarrollo de medicamentos herbarios.

Es importante desarrollar métodos analíticos para llevar a cabo estudios de estabilidad y el control de la calidad, tanto del material vegetal utilizado como ingrediente farmacéutico activo herbario, como de los preparados y medicamentos herbarios que a partir de ellos se desarrollen.

En el caso del *Plectranthus amboinicus*(Lour.) Spreng se dispone de su monografía que incluye la cromatografía de capa delgada en placas de gel de sílice, la reacción de identificación con cloruro de metileno y la reacción de identificación con sulfato de sodio anhidro como ensayos de identificación. Se incluyen, además, las pruebas de determinación de sustancias extrañas (máximo un 2 %), determinación de cenizas totales (máximo un 15 %), contenido de agua (máximo 120 mg/kg) y cenizas insolubles en ácido Clorhídrico (máximo 4 %). Como ensayo de cuantificación se describe la determinación del carvacrol y del timol mediante cromatografía de gases con un detector de ionización por llama, para lo cual se destila previamente el aceite esencial y se utilizan timol y carvacrol como materiales de referencia. La columna utilizada fue de sílice fundida de 60 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno. Como fase estacionaria se empleó el macrogol 20 000 y como gas portador nitrógeno o helio para cromatografía (Farmacopea Europea, 2005).

La validación de los métodos analíticos utilizados en actividades de control y estabilidad desempeña un papel determinante pues de ella depende la comprobación de la confiabilidad de los procedimientos empleados, lo cual contribuye notablemente a la garantía de la calidad, seguridad y eficacia de los mismos.

La regulación del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) a tal efecto, constituye una guía que plantea pautas generales sobre cómo diseñar y acometer la validación de un método analítico. Establece requisitos

mínimos, definidos que deben ser cumplidos por los Centros de Producción para el desarrollo de las validaciones de sus métodos analíticos. Las desviaciones, adiciones o exclusiones de lo establecido en este documento, que se realicen antes o durante el proceso de validación deben ser adecuadamente justificadas desde el punto de vista científico, regulador o de factibilidad económica. (ICH, 2005 a) y b); CECMED, 2007).

1.4 Aspectos generales sobre la validación de técnicas analíticas.

Las técnicas descritas en las farmacopeas deben ser sometidas a procesos de validación que permiten determinar los parámetros de desempeño de dichas metodologías, siguiendo los procedimientos descritos en las normas Conferencia Internacional de normalización (ICH, 2005 a) y b); Eurachem, 2005; CECMED, 2007).

A continuación se presentan los aspectos mas importantes, comunes para dichas normas, y que fueron tomados en consideración en el presente trabajo.

La Validación es el establecimiento de pruebas documentales, que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados.

No es obligatoria la utilización de métodos de ensayo descritos en Farmacopea. El empleo de métodos estandarizados o desarrollados en el laboratorio es aceptable siempre y cuando se demuestre su equivalencia y relevancia.

Existen características de funcionamiento que definen la aptitud de un método analítico para el uso al que se destina. Dichas características son las siguientes.

Características de practicabilidad: Son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica. Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, costo, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

Características de idoneidad: Son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método. La idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de su uso.

Características de fiabilidad: Son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad,

exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, así como selectividad.

A continuación se define cada parámetro de validación y se citan sus principales criterios de evaluación (Apers, 2003):

Linealidad: Capacidad de un método de generar una respuesta linealmente proporcional a la concentración del analito.

Se efectúa tanto sobre disoluciones patrón de analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito.

Los estudios de linealidad responderán a diseños similares a los que se describen a continuación:

a) El ensayo se puede efectuar tanto con material de referencia del analito, como con muestras problemas preparadas a concentraciones de analito que cubran el intervalo del método. Cuando se trata de la evaluación de un ingrediente farmacéutico activo, se analizarán de tres a cinco disoluciones de patrón, en un intervalo de concentraciones entre 80 y 120 % de la concentración teórica. Cuando se trata de la valoración del ingrediente farmacéutico activo en un producto terminado se analizarán entre cinco y siete disoluciones de patrón en un intervalo de concentraciones entre 50 y 150% de la concentración teórica del ingrediente farmacéutico activo en la muestra. En los dos casos el análisis se realiza como mínimo por triplicado.

b) Se evaluarán los datos estadísticamente a fin de verificar la linealidad y proporcionalidad según se describe a continuación:

- Significación de la regresión: Se determinará el coeficiente de correlación (debe ser $\geq 0,990$) y el de determinación (valores superiores a 0,98).
- Verificación de linealidad: Se efectuará por determinación del Coeficiente de Variación de los factores de respuesta (cociente respuesta / concentración), el cual no será superior al 5%. También se evaluará la varianza de la pendiente de la línea de regresión.
- Verificación de proporcionalidad: Los resultados de este ensayo deberán incluir el 0 para el grado de probabilidad definido.
- Prueba de falta de ajuste: Se implementará para demostrar que los valores se ajustan a una línea recta.

Precisión: Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas.

Debe investigarse la precisión utilizando muestras homogéneas, auténticas. Si no es posible obtener una muestra homogénea se emplean muestras artificialmente preparadas o una disolución de la muestra. Las muestras a incluir en este estudio serán muestras reales.

a) Repetibilidad: Es la medida de la precisión de un método llevada a cabo sobre la base de un número suficiente de determinaciones de una mezcla homogénea del producto, en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio con los mismos equipos y reactivos, generalmente en un corto intervalo de tiempo.

b) Precisión intermedia: Es la medida de la precisión dentro de un laboratorio cuando se emplea una muestra homogénea y se analiza en condiciones diferentes, es decir analista diferente, días diferentes en equipos diferentes. Para su evaluación se implementará un diseño donde se evaluarán tres concentraciones de una muestra (como mínimo) en duplicado, por al menos dos analistas en tres días diferentes.

Exactitud: Es el grado de concordancia entre el valor real y el valor medido. Se expresa como el desvío o el error porcentual entre el valor observado (experimental) y el valor verdadero. La determinación de la exactitud deberá realizarse por estudios de adición y recuperación de cantidades conocidas de muestras de referencia o patrones a excipientes a fin de comparar el valor medido experimentalmente (observado) con el valor real (esperado).

La determinación de este parámetro podrá realizarse por diferentes métodos, para la determinación de la exactitud en matrices de plantas medicinales solo es aplicable el método de adición de patrón, en el cual se tomarán alícuotas de una muestra a las que se añaden cantidades conocidas de un patrón, dejando una alícuota como control de muestra.

Dichas muestras se analizarán en paralelo, por triplicado y se evaluarán contra una curva de calibración preparada con disoluciones patrones. Se calculará la recuperación como medida de exactitud y su significación por pruebas estadísticas apropiadas.

Especificidad o selectividad: Capacidad del ensayo para identificar o medir el analito en una muestra en presencia de otros componentes previsibles en el producto (impurezas, productos de degradación).

La evaluación de la especificidad, en función de las características de los métodos de ensayo, deberá estar dirigida a demostrar que el método es capaz de identificar el

ingrediente farmacéutico activo en presencia de otras sustancias, que el mismo permite una evaluación cualitativa o cuantitativa de las impurezas específicas y se asegurará que la señal medida por el método analítico corresponde exclusivamente al analito sin interferencias de excipientes, productos de degradación o impurezas.

Límite de Detección y Cuantificación:

Límite de cuantificación: Cantidad más baja de analito que puede medirse cuantitativamente en una muestra con exactitud y precisión aceptables.

Límite de detección: Cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, como una concentración o cantidad exacta. La evaluación de ambos parámetros puede efectuarse según lo siguiente.

Relación señal ruido: Se compararán la respuesta del blanco (matriz sin analito) con las muestras que contienen pequeñas cantidades de analito adicionadas al blanco. Deberá obtenerse el nivel medio de ruido del blanco y se multiplicará por 2 o 3 para el límite de detección o por 6 o 10 para el de cuantificación. Posteriormente se compararán estos valores con las respuestas de las series blanco más analito y se hallará la concentración de analito.

Sensibilidad: Capacidad del ensayo para registrar pequeñas variaciones de la concentración (Es la pendiente de la curva de calibración). En un método analítico sensible, ligeros incrementos de concentración, coincidirán con aumentos notables en la señal o respuesta.

1.5 Consideraciones generales de jarabes.

Los jarabes se usan desde hace mucho tiempo y antes de descubrirse el azúcar, se preparaban con miel. Su empleo se generalizó ampliamente porque enmascaran el sabor desagradable de algunas drogas y se conservan por más tiempo. Por su bajo o escaso contenido de alcohol son aceptados con mayor preferencia por niños y adultos. Los líquidos que habitualmente integran el jarabe son el agua destilada, soluciones, extractivas, zumos, y otros.

Los jarabes se definen como soluciones acuosas con alta concentración de sacarosa, de consistencia viscosa, en la que se encuentra el o los principios activos y aditivos. Se presentan como líquidos homogéneos, transparentes, brillantes, incoloros o coloreados, de sabor y olor agradable.

En la elaboración de jarabes es necesario emplear sacarosa selecta, agua purificada libre de sustancias extrañas y recipientes y envases limpios, es preciso prepararlos con cuidado para evitar la contaminación y se puedan conservar permanentemente.

Existen varios métodos de preparación de jarabes, cuya elección depende de los caracteres físicos y químicos de las sustancias que intervienen en la formulación. Los cuatro métodos reconocidos oficialmente son: solución por medio de calor; agitación sin calor; simple adición del líquido medicinal al jarabe; lixiviación.

Los jarabes se conservan a temperaturas menores de 25 grados Celsius, otro medio es la concentración. No se recomienda la adición de benzoatos, ácido bórico, ácido salicílico, alcohol, etc. para evitar la fermentación ya que le comunican al jarabe su propio sabor (Martin et al, 1965).

Los jarabes son sometidos a pruebas que avalen su estabilidad físico-química, cumpliendo con las normas establecidas para la calidad. Se realizan controles para la determinación del pH, características organolépticas, contenido promedio, la densidad y el índice de refracción.

Ingredientes:

Principio activo (1 o más), coadyuvantes, vehículo, modificador de la solubilidad, modificador del pH, correctivos de sabor, correctivos de olor, correctivos de color, conservadores, antimicrobianos, agentes secuestrantes, antioxidantes.

1.5.1 Problemas a considerar en este tipo de formulación: Estabilidad.

En general, los fármacos son menos estables en los medios acuosos que en el estado sólido; por lo tanto es importante estabilizar las soluciones que contengan agua. En estos productos pueden producirse reacciones químicas simples como:

- Interacciones entre los componentes (lo que refleja una formulación deficiente)
- Interacciones entre el envase y el producto
- Provoca un cambio de pH del producto
- Provoca que componentes sensibles al pH, precipiten o ocurra una reacción directa con agua (hidrólisis).
- Autoxidación.
- Contaminación Microbiana.
- Sobresaturación.

La estabilidad del fármaco y la formulación son un criterio importante para la aceptación o rechazo de una forma de dosificación: Las formas más comunes de inestabilidad son:

- ✓ Inestabilidad química (degradación)
- ✓ Inestabilidad toxicológica (debido a degradación)
- ✓ Inestabilidad biofarmacéutica (BD)
- ✓ Inestabilidad física
- ✓ Inestabilidad microbiológica.

Capítulo 2. Materiales y métodos.

La investigación se realizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia, durante la etapa comprendida desde enero de 2010 hasta marzo del 2013.

2.1 Materiales, reactivos, disolventes, equipos e instrumentos de medición.

Materiales.

Se utilizaron los jarabes al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano francés) elaborados en el CPL de Placetas Villa Clara.

La formulación empleada para la elaboración del jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Extracto fluido de orégano francés	10 mL
Metil parabeno	0,18 g
Propil parabeno	0,02 g
Alcohol etílico	1 mL
Jarabe simple c.s.p	100 mL

2.1.1. Reactivos y disolventes.

Cineol, SAFC

Timol, SAFC

Carvacrol, SAFC

Etanol al 70 %, calidad farmacéutica.

Agua destilada.

2.1.2 Equipos e instrumentos de medición.

Balanza digital, Boeco, Alemania.

Cromatógrafo Gaseoso, AGILENT 6890N series, Estados Unidos.

Micropipetas de 5, 20, 100, 1000 µL, EPENDORF, Alemania.

Ph-metro microprocesador, HANNA modelo 213, Estados Unidos.

Refractómetro de Abbe, ATAGO, Japón.

Cristalería de laboratorio.

2.2 Método de cromatografía de gases para la determinación simultánea de timol y carvacrol en los jarabes al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng elaborados en el CPL de Placetas, Villa Clara.

El método se basa en la separación de timol y carvacrol del resto de los componentes del jarabe, utilizando cromatografía de gases, mediante una columna capilar con fase estacionaria de baja polaridad, nitrógeno como gas portador y detector de ionización por llama.

Disolución de referencia: Se preparó una disolución que contenía simultáneamente patrones de timol y carvacrol de concentración 2 y 4 mg/mL. Se añadió cineol de concentración final 0,16 mg/mL, como estándar interno. El disolvente utilizado fue etanol al 70 %.

Disolución de muestra: Se colocó 1 mL del jarabe de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng al 10%, 1 mL de estándar interno de 4 mg/mL (concentración final en 25 mL de 0,16 mg/mL) en un matraz aforado de 25 mL y se completó el volumen con etanol al 70 %.

Procedimiento para la cuantificación: Se inyectó 1 µL de ambas disoluciones. La expresión de cálculo para determinar el porcentaje de ambos metabolitos es la siguiente:

$$C_m = R_m \cdot C_p \cdot 25 / R_p$$

Donde: C_m : concentración de timol o carvacrol en el jarabe, expresada en mg/mL; 25: factor de dilución; R_m : coeficiente de respuesta de la muestra; R_p : coeficiente de respuesta del patrón; C_p : concentración del patrón (mg/mL).

2.3 Validación del método de cromatografía de gases para la determinación simultánea de timol y carvacrol en el jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (ICH, 2005; CECMED, 2007; USP 35, 2012).

Linealidad: Se tomaron como concentraciones del patrón de trabajo de carvacrol: 2,5; 5, 7,5; 10; 12,5 y 15 mg/mL. Se realizó la evaluación estadística de la curva de calibración mediante Microsoft Office Excel (2003). Para el timol se prepararon concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg/mL.

Precisión: Se incluyó la repetibilidad y la precisión intermedia. Se desarrolló el procedimiento de preparación de muestra descrito en el epígrafe 2.2. Para la

repetibilidad se analizaron cinco muestras en condiciones homogéneas: un mismo analista y en un mismo día. Para la precisión intermedia se procedió de forma similar, por un analista en dos días diferentes. Se llevó a cabo el procesamiento estadístico de los resultados, se determinó el coeficiente de variación para la repetibilidad y para la precisión intermedia. Se empleó, además, para evaluar la precisión intermedia, el coeficiente de variación de Horwitz.

Exactitud (Veracidad): Se tomaron seis alícuotas del jarabe; se añadió 1 mL de cineol (estándar interno) y cantidades ascendentes de los patrones de timol y carvacrol, según el intervalo lineal de concentraciones, correspondiente a cada uno de ellos y la concentración esperada en el jarabe.

Se procedió a la cuantificación, de igual manera que para la preparación de las disoluciones de muestras en el ensayo de precisión. Se realizaron dos réplicas de este experimento. Las concentraciones añadidas y recuperadas se representaron en un gráfico y se evaluó el recobrado. Se calcularon los porcentajes de recuperación para cada una de las muestras analizadas. Criterio adoptado: recobrado 98 % –102 % (ICH, 2005; CECMED, 2007; USP 35, 2012).

Límites de detección y cuantificación: Se desarrolló el procedimiento para la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) descrito en las normativas internacionales (lecturas repetidas del blanco) (ICH, 2005; CECMED, 2007; USP 35, 2012).

Especificidad:

Se preparó una disolución del jarabe sin degradar y degradado (condiciones de vida de estante), según el procedimiento de preparación de muestra descrito en el epígrafe 2.2. Se valoró la ocurrencia o no de interferencias en el análisis (picos no resueltos en los cromatogramas), debidas a sustancias auxiliares del jarabe y productos de degradación que pudieran haberse generado en las muestras, a partir de los metabolitos en estudio o cualquier otro componente presente en dicho jarabe.

2.4 Estudio de estabilidad de estante del jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Se evaluó la estabilidad física y química del jarabe, a tiempo cero, tres meses, seis meses y un año, teniendo en cuenta los parámetros: características organolépticas, índice de refracción, densidad, pH y concentración de timol y carvacrol.

Capítulo 3. Resultados y Discusión.

3.1 Determinación simultánea de timol y carvacrol en los jarabes al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng elaborados en el CPL de Placetas, Villa Clara mediante la cromatografía de gases.

Se partió del método desarrollado para la determinación de timol y carvacrol en el extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, (Vega,2011). Las modificaciones estuvieron encaminadas al ajuste de flujo óptimo con vistas a lograr la máxima eficacia para la nueva muestra y al acortamiento del tiempo total de corrida, a través de la realización de cambios en la meseta final del programa de temperatura, con el objetivo de minimizar el tiempo del análisis.

Como en estudios anteriores, la columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria de baja polaridad (de uso general): polidimetilsiloxano de 1 µm de espesor, de 30 m de longitud y 0,53 mm de diámetro interno y con el empleo de nitrógeno como gas portador, resultó adecuada para la separación de timol y carvacrol de los demás componentes del jarabe, tales como sacarosa y otros metabolitos procedentes del extracto inicial.

Estas condiciones permiten, además, que se pueda registrar en los cromatogramas la aparición de nuevos picos, productos de la degradación de las muestras; lo cual resulta muy útil en la evaluación de la estabilidad del jarabe.

La nueva matriz que acompaña a los metabolitos de interés, si bien se simplifica por la disminución de la concentración de componentes no deseados, hace que los analitos de interés también estén en más baja concentración; además, la presencia de sacarosa complejiza en alguna medida el proceso de separación.

Estos cambios hicieron necesaria la validación del método de análisis.

Como en el trabajo precedente (Vega, 2011), debido a la complejidad de la muestra a analizar fue necesario utilizar el modo de operación de temperatura programada, el cual permite separar eficazmente compuestos de distinta volatilidad y por consiguiente, constantes de equilibrio de reparto gas – líquido muy diferentes si se utilizara un modo isocrático, que traerían como consecuencia directa, eluciones a tiempos de retención distantes.

En ese sentido se comenzó la separación a una temperatura relativamente baja (55 °C), durante 1 minuto, bajo la cual eluye el etanol empleado y los compuestos más volátiles del jarabe. Luego de incrementar la temperatura hasta 140 °C, a razón de 3 °C por minuto, eluyen en la meseta, durante 15 minutos, primeramente toda una serie de componentes menos volátiles, el cineol ($t_r = 11,99$ min), empleado en este trabajo como estándar interno y que aparece con una resolución adecuada respecto a los componentes más cercanos en tiempos de retención y luego eluyen separados el timol y el carvacrol a los tiempos de retención de 24,02 y 24,48 min ± 5 %, respectivamente (Figura 3).

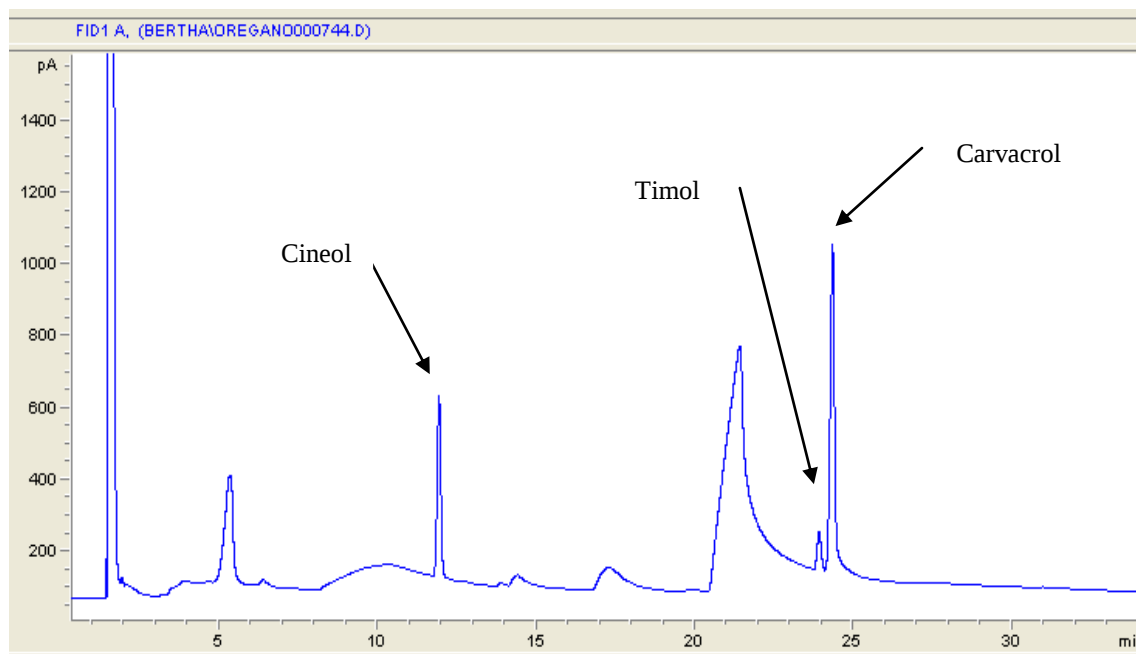


Figura 3. Separación cromatográfica de timol y carvacrol en el jarabe de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

La resolución calculada fue de 1,15. Aunque idealmente se describe que esta debe ser superior a 1,50, bajo las condiciones actuales de desarrollo de softwares cromatográficos, para los trabajos prácticos es suficiente con que esta sea superior a 1,00 para que se pueda realizar una evaluación cuantitativa (integración) de los picos sin que se afecten los parámetros de desempeño del método de análisis (Dierksmeier, 2005).

Bajo las condiciones de análisis, las concentraciones de timol y carvacrol en el jarabe de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng fueron de 54,98 mg/mL y 184,42 mg/mL, respectivamente.

3.2. Validación del método analítico para el control y la evaluación de la estabilidad del jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Linealidad: Según el análisis de las tres réplicas realizadas a las curvas de calibración en el intervalo de concentraciones de 2,5 a 15 mg/mL de carvacrol, se obtuvo el siguiente modelo matemático: $y = 2,2168x - 0,0187$. Para el timol, el modelo matemático resultó ser: $y = 0,237x + 0,0059$ para el intervalo de concentraciones de 0,5 a 2,5 mg/mL (Figura 4). Donde: x: concentración de analito en mg/mL, y: respuesta (coeficiente de respuesta respecto al cineol).

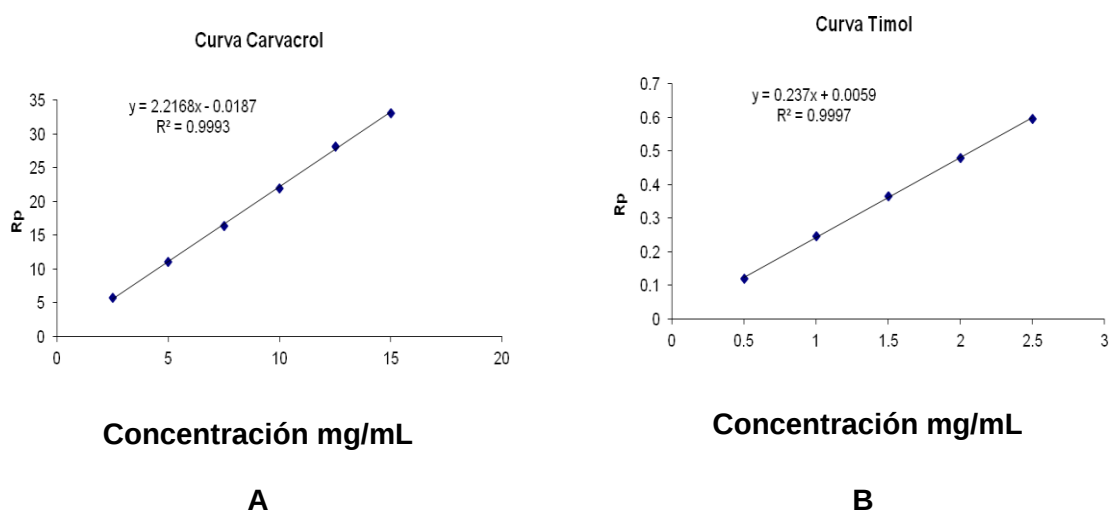


Figura 4. Curvas de calibración correspondientes al experimento de linealidad. A – carvacrol; B – timol.

Los resultados estadísticos cumplen con lo establecido para este parámetro, por lo que se puede afirmar que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones evaluado (Tabla 1) (ICH, 2005 a y b).

Tabla 1. Resultados de la evaluación de la linealidad para carvacrol y timol.

	r	CV _f %	Sb _{rel} %	CC	a±Sat
Carvacrol	0,9996	1,72	1,25	0	-0,330 a 0,831
Timol	0,9998	1,40	1,33	0	-0,135 a 0,322
Criterio	> 0,9900	< 5,00	< 2,00	< 2,5	Contener el 0

Donde: r – coeficiente de correlación

CV_f % - coeficiente de variación de los factores de respuesta

Sb_{rel} % - desviación estándar relativa de la pendiente

CC- coeficiente de calidad

a±Sat – intervalo de confianza para el intercepto

Precisión: Se evaluó la precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Para la repetibilidad se determinó el coeficiente de variación (%) de los valores de concentración de carvacrol y timol (Tablas 2 y 3) los cuales fueron de 0,133 y 0,159 %, respectivamente. Estos valores se consideran adecuados (Apers, 2003; ICH, 2005 a) y b); CECMED, 2007; USP,2007).

Tabla 2. Resultados de precisión de carvacrol.

REPETIBILIDAD				
Conc. (mg/mL)	Parámetros estadísticos			
184,32	Media		184,10	
184,19	Desviación estándar		0,244	
183,97	CV (%)		0,133	
183,74				
184,29				
PRECISIÓN INTERMEDIA				
<u>Día 1</u> Conc. (mg/mL)	<u>Día 2</u> Conc. (mg/mL)	<u>Día 3</u> Conc. (mg/mL)	Parámetros estadísticos	
184,32	184,55	184,00		
184,19	184,49	184,29	$\bar{x}$	184,18
183,97	183,99	184,07	Desv. Est. =	0,252
183,74	184,34	183,74	CV (%) =	0,140
184,29	184,32	184,42	Horwitz (%)=	1,82

Por todo lo planteado anteriormente puede decirse que el método es preciso ($CV_{\text{entre días}} < CV_{\text{Horwitz}}$).

Tabla 3. Resultados de precisión de timol.

REPETIBILIDAD				
Conc. (mg/mL)	Parámetros estadísticos			
54,985	Media		54,95	
54,872	Desviación estándar		0,087503	
55,086	CV (%)		0,159 %	
54,881				
54,940				
PRECISIÓN INTERMEDIA				
<u>Día 1</u> Conc. (mg/mL)	<u>Día 2</u> Conc. (mg/mL)	<u>Día 3</u> Conc. (mg/mL)	Parámetros estadísticos	
54,985	54,999	54,957		
54,872	54,879	54,899	$\bar{x}$	54,965
55,086	55,095	55,189	Desv. Est. =	0,093
54,881	54,888	54,898	CV (%) =	0,17
54,940	54,947	54,955	Horwitz (%)=	2,19

Por todo lo planteado anteriormente puede decirse que el método es preciso ($CV_{\text{entre días}} < CV_{\text{Horwitz}}$).

Exactitud (Veracidad): Cuando se trabaja con matrices complejas, como es el caso de los productos herbarios, cualquiera sea su forma de presentación, el procedimiento de adición de estándar es la única opción viable para evaluar la exactitud del método, a través de la elaboración de una curva de añadido - recobrado. La recuperación

calculada, en este caso, para carvacrol y timol fue de 99,8 y 98,3 %, respectivamente en correspondencia con la pendiente de las curvas de recuperación (Figura 5).

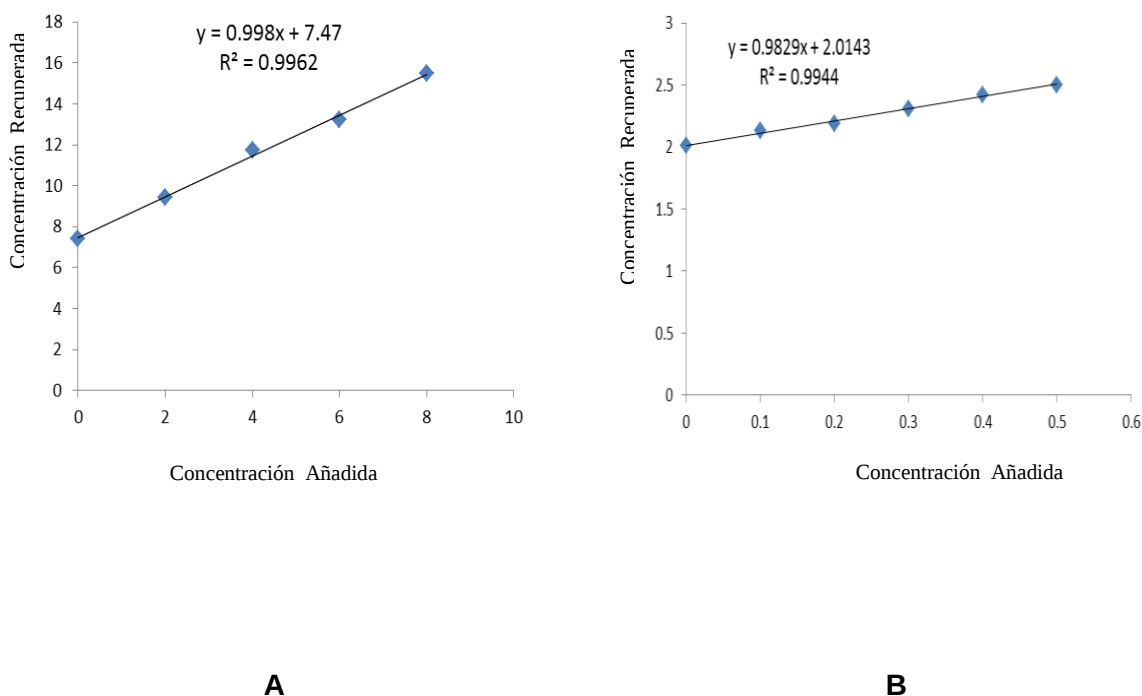


Figura 5. Dependencia lineal entre la concentración añadida y recuperada de A - carvacrol y B – timol.

Límite de cuantificación y límite de detección: El límite de detección fue de 0,525 mg/mL para carvacrol y 0,155 mg/mL para timol. Los límites de cuantificación fueron de 0,55 y 0,25 mg/mL, respectivamente (ICH, 2005 a) y b), CECMED, 2007; USP,2007).

Especificidad: Al analizar comparativamente el cromatograma obtenido para el patrón y para el jarabe fresco (Figuras 6 y 7), se observa que no existe solapamiento de picos que pudiera dar indicio de interferencias en el análisis cuantitativo con vistas al control de calidad. Se obtuvieron los picos correspondientes a los metabolitos, bien resueltos y sin la aparición de colas, frentes difusos, hombros, ni variaciones significativas en los factores de simetría de ambos picos (0,8 y 0,4 para timol y carvacrol, respectivamente).

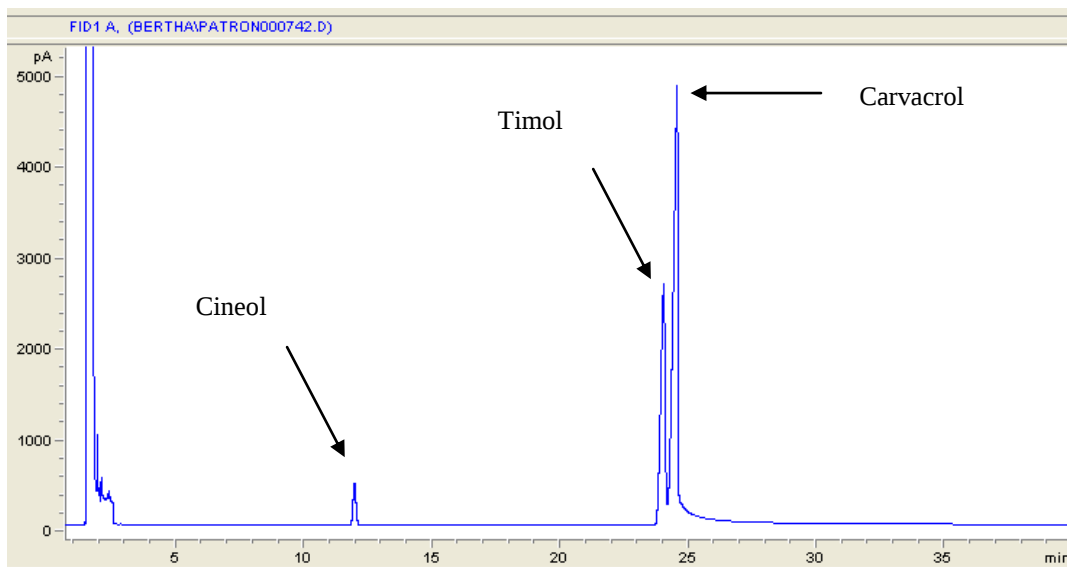


Figura 6. Cromatograma de la disolución de patrón de timol y carvacrol con su estándar interno: cineol.

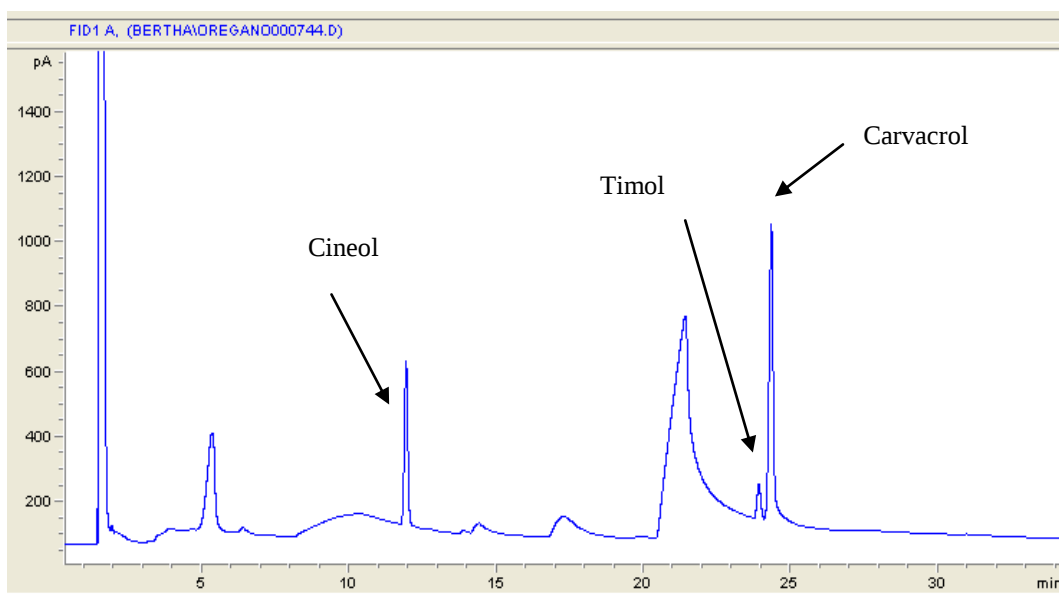


Figura 7. Cromatograma de la disolución de jarabe fresco.

Teniendo en cuenta el cumplimiento de todos los parámetros de validación, la técnica analítica es fiable y puede ser utilizada en el control de la calidad del jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

4.3 Estudio de estabilidad de estante del jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

En la tabla 4 se observan los resultados de algunas pruebas físicas realizadas al jarabe fresco y al cabo de un año. Excepto en los caracteres organolépticos se observan variaciones significativas en los resultados.

Tabla 4. Evaluación de parámetros de calidad del jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, fresco y al cabo de un año.

	C. Organolépticos	pH	Densidad	Índice de refracción
Tiempo cero	cumple	6,52	1,28	1,425
Tiempo final	cumple	5,11	1,27	1,437

Luego del análisis cuantitativo, se obtuvo que, al cabo de los tres meses ya se evidenciaba una degradación del 71,3 % para el carvacrol y del 93,6 % para el timol.

Las figuras 8, 9 y 10 muestran que, a partir de los tres meses, la degradación es elevada y aparecen nuevos picos de productos de degradación, que no necesariamente provienen de los metabolitos de interés.

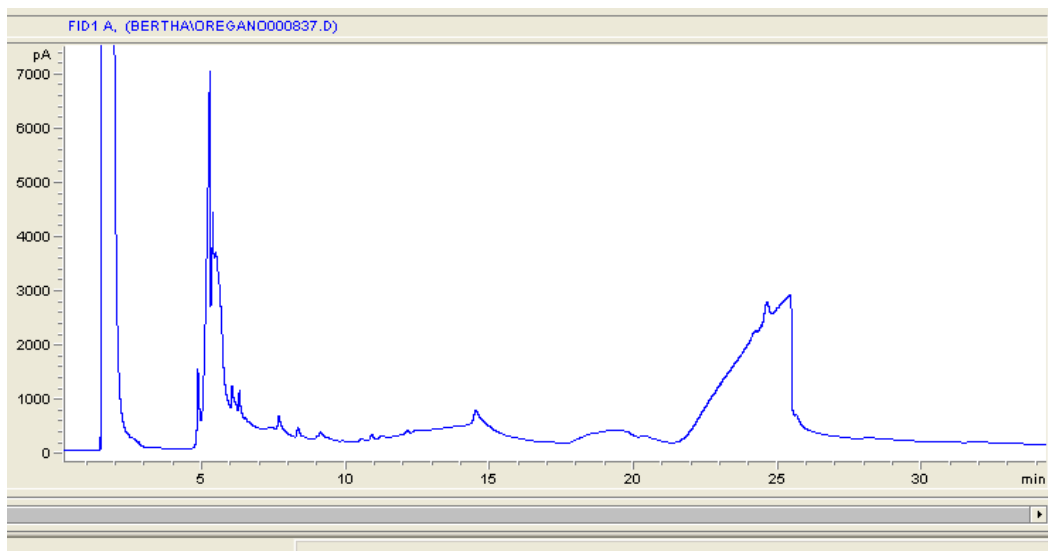


Figura 8. Cromatograma del jarabe al 10% a los 3 meses (vida estante).

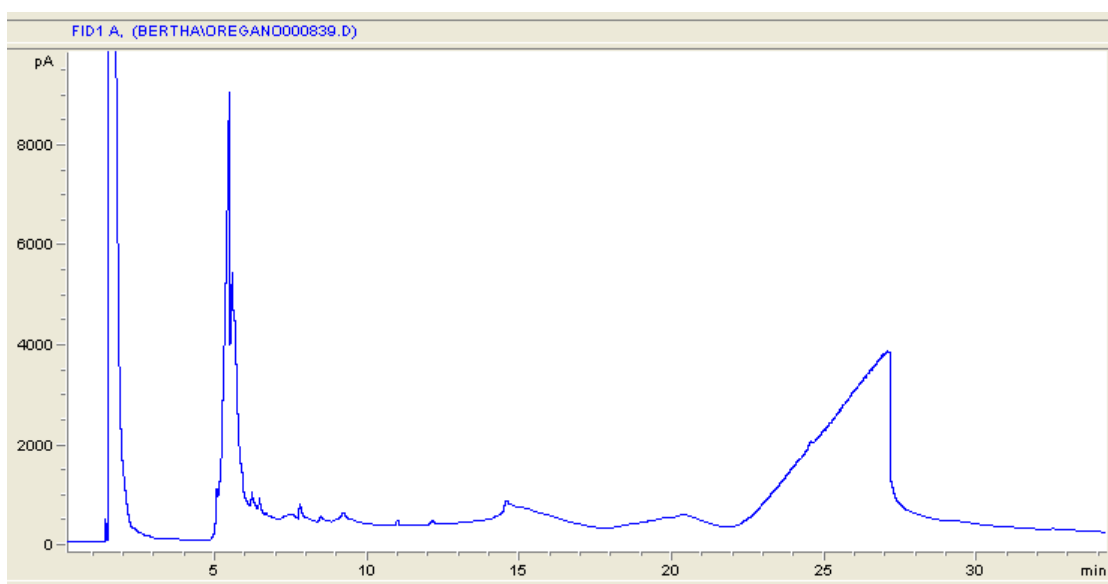


Figura 9. Cromatograma del jarabe 10% a los 6 meses (vida estante).

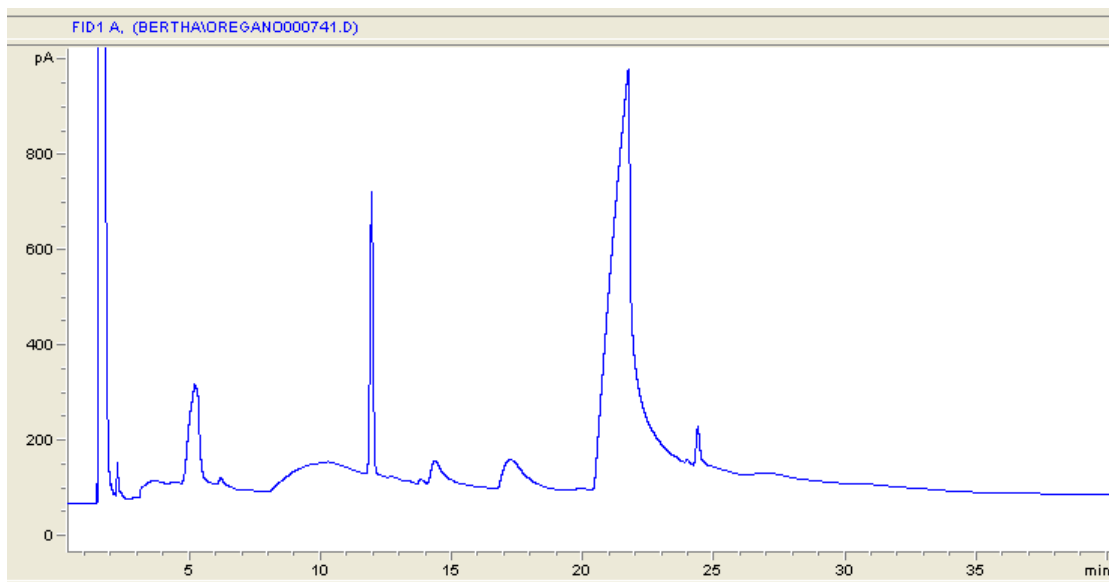


Figura 10. Cromatograma del jarabe al 10% a los 12 meses (vida estante).

De lo anterior se deduce que el jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng solo puede ser utilizado durante un período inferior a los tres meses a partir de su fecha de fabricación.

CONCLUSIONES.

1. El método analítico para la cuantificación de timol y carvacrol en el jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng por cromatografía de gases, desarrollar es fiable.
2. A partir de los tres meses el jarabe al 10% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng no cumple con las características físicas y químicas que permiten su utilización.

RECOMENDACIONES.

1. Emplear el método desarrollado y validado para el control de calidad y la evaluación de la estabilidad del Jarabe al 10 % de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

BIBLIOGRAFIA

1. **ALVARADO, ROBERTO**.2000. *Medicina Integral*, junio
2. **APERS, S., THEUNIS, M.** 2003. Validation of Physicochemical methods, version 4.00. Serie de informes técnicos de laboratorio, Universidad de Amberes, Bélgica
3. **ARTECHE, A.** 2000. *Historia de la Medicina naturista española*. Editorial triacastela.Madrid.
4. **BAERTSCHI, S.W.** 2005. Pharmaceutical stress testing. Edn. Taylor and Francis Group: Indiana. USA.
5. **BERDONCES, J. L.** 1995. Principios activos y preparaciones farmacéuticas. *Natura medicatrix.*, 37 – 38, pp. 50 – 53.
6. **BILIA, A. y col.** 2001 Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *International Journal of Pharmaceutics*; 213(3), pp. 199-208.
7. **BLACPM**. 2002. Boletín de Plantas Medicinales y Aromáticas. Gobierno de Chile, Fundación para la Innovación Agraria: Boletín Trimestral No 6.
8. **BRAITHWAITE, A., SMITH, F.J.** 2004. Chromatographic methods. Edn. Félix Varela. Ciudad Habana. Cuba.
9. **CECMED.** 2000. Regulación No. 16 "Directrices sobre Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos
10. **CECMED.** 2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos. Regulación No. 24. La Habana.
11. **CECMED.** 2007. Validación de métodos analíticos. Regulación No. 41, La Habana.
12. **CUELLAR, A., MIRANDA, M.** 2000. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Cuba: Edn. Universidad de La Habana: Ciudad de la Habana.
13. **DEWICK, P.M.** 2002. Medicinal natural products. Edn. John Wiley & Sons: England
14. **DÍAZ DE ARMAS, M., y col.** 1998. Validación de Técnicas analíticas utilizadas en el Control de la Calidad. *Rev Cubana Farm*, 32(2), pp. 106-12.
15. **DÍAZ SOTO, L.** 1992. Acción antibacteriana de los aceites de Cymbopogon citratos (caña santa) y de Plethranthus amboinicus (Orégano francés). Informe Técnico de Investigación concluida ISMM.
16. **DIERKSMEIER, G.** 2005. Métodos Cromatográficos. Ed. Científico – Técnica. La Habana. Cuba
17. **EURACHEM GUIDE.** 2005. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". Reino Unido, pp. 12-20.

18. **EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA)**. 2002. Final Comments for Revision of the Notice to Applicants Volume 2B Part II: Concerning Chemical, Pharmaceutical and Biological Documentation for Vegetable Medicinal Products. London, pp. 1-6.
19. **EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA)**. 2005. Working part on Herbal Medicinal products (HMPWP), stability testing of HD, HDP, and HMP. London, pp. 7-17.
20. **EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA)**. 2009. Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. London, pp. 1-4.
21. **EVANS, W.C.** 2000. Pharmacognosy. 15th.edn. Edn. Saunder: Reino Unido
22. **FARMACOPEA BRITÁNICA**. 2004 London: Her Majesty's Stationery Office.
23. **FARMACOPEA EUROPEA**. 2005. European Directorate for the quality of medicines. 5ta edn. Council of Europe: Strasbourg, France
24. **FORMULARIO NACIONAL**. 2010. Ed. Ciencias Médicas: La Habana. Cuba. p 84-85.
25. **FUENTES, V; GRANDA, M.** 1997. Conozca las plantas medicinales. Ed. Científico – Técnica. La Habana. Cuba. p 104-105.
26. **GONZÁLEZ M. y col.** 2007. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales; **6**(4), pp. 118-124.
27. **HANDA, SS.** 2007. Status of Medicinal and Aromatic Plants (MAPs) Utilization Globally Including Issues of Quality Control and Technologies for Large Scale Production of Plant Based Products. United Nations Industrial Development Organization (UNIDO). Expert Group Meeting. Industrial Utilization of Medicinal and Aromatic Plants. Abuja, Nigeria 20-22 nd November.
28. **HERNÁNDEZ, D. L., RODRÍGUEZ, J. M.** 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. Rev. Cubana Plant Med, (2), pp. 44-7. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Departamento de Investigaciones Microbiológicas.
29. **HUYNH, B.A.** 2009. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Regulations, Methodologies, and best practices. Edn. Springer: USA.
30. **ICH, a).** 2005. Harmonised Tripartite Guideline. "International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability". Part VIII. Federal Register. FDA. USA, Geneva
31. **ICH, b).** 2005. Harmonised Tripartite Guideline. "International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for

- Human Use: Validation of analytical procedures and Methodology, ICH-Q2 A y B, Geneva.
32. **ICH.** 2003. Harmonised Tripartite Guideline. Guidance for industry. Stability testing of new drug substances and products, ICH- Q1A (R2), Geneva.
 33. **ICH.** 2005. Validation of Analytical Methods: Definitions and Technology. London, UK
 34. **KHARE, C.P.** 2007. Indian medicinal plants. An illustrated dictionary. Edn. Springer: New Delhi. p. 464.
 35. **KLICK, S. y col.** 2005. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. *Pharmaceutical Technology*; **2**(1), pp. 48-66
 36. **MARTIN, E; COOK, E; LAUALLEN, E; OSOL, A; TICE, L; VAN METER, C.**1965. FARMACIA PRACTICA DE REMINGTON. 2da. Edición.
 37. **MARTÍNEZ, M., CUELLAR, A.** 2001. Farmacognosia y Productos Naturales. Edn. Félix Varela: La Habana. Cuba
 38. **MITCHELL, S.A., AHMAD, M.H.** 2006. A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948 - 2001. *West Indian Med J.*; **55**(4), pp. 243–269
 39. **MORÓN, F.** 1991. Programa de Medicina Tradicional en Cuba. Las plantas medicinales en la terapéutica. *Rev. Cubana Medicina General Integral*, 7(3), pp. 276-9
 40. **MORÓN, F.** 2002 *Farmacología general. Plantas medicinales y medicamentos herbarios.* La Habana: Editorial Ciencias Médicas. p. 195
 41. **MORÓN, F.** 2007. Plantas medicinales: siete respuestas sobre la experiencia cubana: Infomed. Salud Vida
 42. **NAIR, R., CHANDA, S.** 2006. Activity of some medicinal plants against certain pathogenic bacterial strains. *Indian J Pharmacol.* **38** (2), pp. 142-144.
 43. **OMS.** 1998. World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials. Salvat: Geneva
 44. **OMS.** 2002. Guideline on Good Sourcing Practices (GSP) for Medicinal Plants. Salvat: Geneva
 45. **PINGALE, S., RAGHUNATH, D., PINGALE M.S.** 2008. Stability study of an herbal drug. *Pharmacologyonline*; **1**, pp. 20-23
 46. **RICK, N.G.** 2009. *Drugs from Discovery to Approval.* Second edn: Singapore
 47. **SARFARAZ, N.** 2007. Handbook of preformulation. Chemical, biological and botanical drugs. Edn. Informa Healthcare: New York. USA
 48. **SCULL LIZAMA, R. y col.** 1998. Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río. Estudio etnobotánico. *Rev. Cub. Farm.*, 32(1), pp. 57-62.

49. **SOLER, BENITO.**1997. " Experiencia cubana en el estudio y aplicación de medicamentos herbarios" Editorial. *Rev Cubana de Plant Med*; 2(1):30-34.
50. **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 35).** 2012. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. USA
51. **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP).** 2007. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 30th edn: Rockville, MD. USA
52. **VEGA, L.M.** Desarrollo y validación de métodos analíticos, mediante la cromatografía de gases, para evaluar la estabilidad del extracto fluido utilizado en la elaboración del Jarabe al 20% de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Tesis de Maestría. 2011
53. **VLIETINCK, A.** 2004. Standarization, quality control and registration of herbal medicinal products. Edn. CYTED: Santa Fé de Bogotá. Colombia.
54. **ZHANG X.** 1996.Traditional medicine. *WHO Handard Medicus*;39(3):103.(OMS)