


**Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**



**“Evaluación de la estabilidad de una tintura comercial con propiedades
Antiamebianas, preparada a partir de flores de *Jacaranda mimosifolia*, hojas de
Psidium guajava, hojas y flores de *Tagetes lucida* y hojas y corteza de *Simarouba
glauca*, en solución alcohólica al 35%”**

Informe final de tesis
Presentado por.

Rolando Hernández Carranza

Previo a obtener el título de
Químico Farmacéutico

Guatemala, noviembre de 2007.

INDICE.

Nombre.	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
4. Justificación	6
5. Objetivos	7
5.1 Objetivos Generales	7
5.2 Objetivos Específicos	7
6. Materiales y Métodos.	8
6.1 Universo y Muestra	
6.1.1 Universo	8
6.1.2 Muestra	8
6.2 Materiales.	8
6.3 Métodos.	10
6.3.1 Diseño Experimental	11
6.3.2 Metodología	11
6.3.2.1 Materias primas	11
6.3.2.2 Producto terminado	12
6.3.3 Análisis microbiológico.	13
6.3.3.1 Determinación de coliformes totales	13
6.3.3.2 Determinación de coliformes fecales	14
6.3.3.3 Determinación de <i>Escherichia coli</i>	15
6.3.3.4 Conteo aeróbico en placa y mohos y levaduras	17
7. Discusión y Resultados	24
8. Conclusiones	40
9. Recomendaciones	41

9. Referencias.	42
10. Anexos	47

1. RESUMEN

Se trabajó en la evaluación de la estabilidad de una tintura con propiedades antimicrobianas, para lo cual, se usó una tintura preparada a partir de la mezcla de las tinturas individuales de cada una de las plantas componentes y otra preparada a partir de la mezcla de las plantas, estas tinturas fueron evaluadas usando la metodología descrita por la Norma Obligatoria Guatemalteca para Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano. COGUANOR 11.01.04:04 (42), sin embargo debido a que se realizó un cambio con respecto a esa norma, el cual consistió en el alargue del tiempo de 90 a 180 días, se usó la norma anterior y la norma corregida para llevar a cabo el estudio.

Se tomaron en cuenta de acuerdo con la norma, características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas, sin embargo no se realizó la cuantificación de los activos porque para productos derivados de plantas son muchos los factores que influyen en la concentración de los activos, lo que hace que no se encuentren en cantidades uniformes aún dentro de materias primas que viene en el mismo lote y al hecho de que en muchos casos no se sabe con certeza que molécula es la que ejerce la acción terapéutica o si es una combinación de las mismas.

Los resultados obtenidos, tanto fisicoquímicos como microbiológicos de las dos tinturas en los dos estudios demostraron que la tintura es estable, aún en las condiciones extremas requeridas por la norma y que ambos estudios a 90 y a 180 días son válidos y que no hubo discrepancias en cuanto a resultados entre uno y otro, por el contrario, se complementaron.

La última prueba que se realizó fue la de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la cuál es una herramienta muy importante para establecer la estabilidad en términos de la actividad inhibitoria contra los microorganismos; las dos tinturas se evaluaron en la etapa final de la fase 2, el estudio a 180 días y se comportaron de manera similar, demostrando que la actividad antimicrobiana no se ve afectada por factores tales como las condiciones extremas del estudio ni la forma en que fueron preparadas las tinturas.

2. INTRODUCCION

Guatemala es un país con vocación netamente agrícola y forestal, con una riqueza natural y cultural enorme, con un elevado potencial para el desarrollo tanto humano como material; sin embargo muchas de las comunidades en especial el área rural, no cuentan con acceso a la atención primaria en salud, ni mucho menos a tratamientos con medicamentos de síntesis adecuados. La mayoría de la población es de origen indígena, sumamente pobre y marginada; la única medicina que utilizan es la tradicional, a base de plantas, infusiones, emplastos, etc. Este tipo de medicina es el más difundido en el país y por lo tanto, se le debe dar la importancia que requiere. Es necesario un proceso de tecnificación que garantice que los medicamentos preparados a partir del conocimiento tradicional sean de la calidad requerida, que los productos estén validados científicamente tanto en sus propiedades terapéuticas como en el desarrollo de estudios de estabilidad acelerada y a largo plazo, para analizar los efectos que ejercen a través del tiempo los diferentes factores ambientales tales como la temperatura, el porcentaje de humedad, la exposición a la luz tanto solar como artificial en dichos productos.

El país no cuenta con estudios en este campo, así como tampoco existe una metodología que norme dichos estudios, de hecho no se realizan. En el caso de los productos fitofarmacéuticos se ha establecido por parte de las autoridades de salud un período de 2 años de fecha de caducidad a partir de la fecha de producción y una vez cumplido dicho período se debe tramitar el registro como si se tratara de un producto nuevo.

Este trabajo tuvo como objetivo realizar una propuesta para la elaboración de un estudio de estabilidad fisicoquímica, organoléptica y microbiológica para iniciar el proceso de tecnificación y documentación para aprovechamiento por la industria de fitofármacos que cumpla con todos los requerimientos a nivel mundial.

3. ANTECEDENTES

No existen referencias previas de un estudio de este tipo en los listados de tesis de la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, la biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala, ni ninguna referencia en páginas de Internet en español.

3.1 Lozoya y colaboradores en 2002 en el estudio Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease, trataron a 50 pacientes, a quienes les fueron administradas cápsulas conteniendo 500 mg del fitofármaco QG-5® en intervalos de 8 horas, determinaron que usando el producto derivado de las hojas de guayaba disminuía la duración de dolor abdominal en dichos pacientes.

3.2 Olajide y colaboradores en 1999 en el estudio Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava* L., determinó que la actividad antiinflamatoria de las hojas de guayaba es producida por el aceite esencial y los flavonoides que esta contiene.(1)

3.3 Cáceres en 1996, en el libro Plantas de Uso Medicinal en Guatemala, con referencia a la especie *Psidium guajava*, menciona que se la atribuyen propiedades antidiarreica, antiespasmódica, astringente, digestiva, emenagoga, hemostática, sedante, vermífuga y vulneraria; que la infusión de corteza y hojas de la misma especie, al ser ensayadas separadamente en ratones por vía oral en dosis de 1 a 5 mg/kg no presente toxicidad alguna.(2)

3.4 Magnez I, Duriez T, Delelis-Dusollier A, Nicolas JP. 1996. Essai de mise en évidence de l'activité antiamebienne de *Jacaranda mimosifolia* D. Don. Bull Soc. Franc. Parasitol 14: 89-93

3.5 Binuto & Lajubutu en 1994, en el estudio Antimicrobial potencial of some plant species of the Bignoniaceae family, concluye que la tintura elaborada con flores de

Jacaranda mimosifolia D. Don es activa contra bacterias gram negativo y contra *Candida albicans*.(5)

3.6 Cáceres en 1993 en el estudio Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacterias of 16 plants concluye que la tintura preparada a partir de hojas de *Simarouba glauca* DC. tiene actividad contra *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* ; que la infusión y tintura preparada con hojas y flores de *Tagetes lucida* Cav poseen actividad contra las bacterias causantes de la diarrea.(11)

3.7 Lutterodt y colaboradores en 1992 en el estudio Inhibition of Microlax induced experimental diarrhoea with narcotic like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. Estableció que el extracto de hojas de guayaba presenta una clara reducción de la amplitud de la respuesta muscular al profundirse intraluminalmente actuando en ratas por un mecanismo de inhibición del aumento de las secreciones acuosas.(12)

3.8 Cáceres en 1990, en el estudio Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening of 84 plants against enterobacterias, establece la actividad contra enterobacterias de las especies tomadas en cuenta para este estudio de estabilidad.(14)

3.9 López en 1990 en el estudio *Tagetes lucida* , Inhibitory effect on smooth muscle contractility, establece la actividad antiespasmódica de el extracto acuoso de *Tagetes lucida* en músculo liso de yeyuno de conejo.(19)

3.10 Cabrera en 1990, en trabajo de tesis Validación científica de la actividad antiespasmódica *In vitro* de *Cecropia obtusifolia* B. (Guarumo), *Chenopodium ambrosioides* (Apazote), *Hyptis pectinata* (Alhucema), *Jacaranda mimosifolia* (Jacaranda) y *Yucca elephantipes* (izote) establece la actividad antiespasmódica de los extractos de estas especies. (23)

3.11 Valle en 1989 en el trabajo de tesis Inhibición de la infección por *Shigelladysenteriae* en cornea de cobayo por extractos de hojas de *Psidium guajava*, *Spondias purpurea* y *Tagetes lucida*, demostró que la pomada a base de tintura inhibe el crecimiento de *Shigella dysenteriae* y disminuye los días en que se da la mejoría en un cuadro de queratoconjuntivitis experimental. (24)

3.12 Ortíz en 1989 en el trabajo de tesis Elucidación del principio activo antiespasmódico en el extracto n-hexano del pericón (*Tagetes lucida*) determinó que el principio activo responsable de la actividad antiespasmódica del pericón es la Hemiarina.(25)

3.13 Marroquín en 1981, en su trabajo de tesis titulado Contribución al Estudio Farmacológico de *Tagetes lucida* (Pericón) como antiespasmódico, determinó que el extracto acuoso de pericón tiene actividad espasmolítica evaluada en un modelo *In vitro* usando duodeno de rata aislado.(35)

3.14 Duriez R. Bailly C, Toustan R. 1962. Glucarrubin in the treatment of amebiasis. Press med. 70: 21-22.

4. JUSTIFICACION

Actualmente, no existe ningún procedimiento para determinar la estabilidad de productos fitofarmacéuticos de tipo tintura en Guatemala y considerando que la tintura antiamebiana, es una de las de mayor venta a nivel nacional por sus propiedades para eliminar los síntomas relacionados con las infecciones microbianas para eliminar los microorganismos.

Además, dicha tintura fue elaborada con plantas que durante muchas generaciones han sido utilizadas por la población para combatir infecciones gastrointestinales con alto grado de eficacia.

Por esto se hizo necesario el diseño de un estudio sistemático y científico, que pudiera ser aplicado hacia otros tipos de productos de este tipo y que garantizara que dicha tintura al salir al mercado va a cumplir con los requerimientos de calidad, eficacia y seguridad.

5. OBJETIVOS

5.1 Generales:

5.1.1 Contribuir al desarrollo tecnológico de la industria de fabricación de medicamentos de uso tradicional.

5.1.2 Establecer bases científicas para el desarrollo de un estudio de estabilidad acelerada de productos fitofarmacéuticos.

5.2 Específicos:

5.2.1 Determinar la estabilidad fisicoquímica, organoléptica y microbiológica de una tintura con propiedades antimicrobianas producida a partir de plantas medicinales.

5.2.2 Determinar la estabilidad de la mezcla de las tinturas individuales de cada una de las plantas constituyentes y la tintura que es la mezcla de todas las plantas según el procedimiento establecido por la Norma Obligatoria Guatemalteca para Productos Farmacéuticos Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano COGUANOR 11.01.04:04 (42).

5.2.3 Establecer las bases de un procedimiento para la evaluación de la potencia antibacteriana de la tintura con propiedades antimicrobianas producida a partir de plantas medicinales.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Universo y muestra:

6.1.1 Universo:

Tintura Antimicrobiana comercial producida en Guatemala disponible en el mercado nacional, preparado a partir de flores de *Jacaranda mimosifolia* (Jacaranda), hojas de *Psidium guajava* (guayaba), hojas y flores de *Tagetes lucida* (Pericón) y hojas y corteza de *Simarouba glauca* (Aceituno), cultivadas de manera orgánica, libre de pesticidas y fertilizantes químicos.

6.1.2 Muestra:

6.1.2.1 Tres lotes de tintura preparados a partir de la mezcla de tinturas individuales de cada una de las plantas constituyentes.

6.1.2.3 Tres lotes de tintura preparados a partir de la mezcla de las materias vegetales de cada una de las plantas constituyentes.

6.2 Materiales:

6.2.1 Materia vegetal desecada de:

- Guayaba.
- Aceituno.
- Pericón.
- Jacaranda.

6.2.2 Cristalería de laboratorio.

- Vasos de precipitar.
- Tubos de ensayo.
- Tubos para análisis microbiológico.
- Cajas de Petri.

- Varillas de agitación.
- Vidrios de reloj.
- Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 mL.
- Crisoles.
- Cápsulas de porcelana

6.2.3 Equipo de laboratorio.

- Pipeteadores
- Mechero Bunsen
- Gas
- Campana microbiológica
- Percoladores.
- Horno
- Mufla
- Potenciómetro.
- Balanza analítica.
- Cámara de estabilidad a 40°C y 70% de Humedad relativa

6.2.4 Reactivos y materiales.

- Caldo lactosado
- Caldo Bilis Verde Brillante
- Caldo *Escherichia coli*.
- Agar Sabouraud
- Agar Plate Count
- Solventes: Etanol 35% y agua.
- Gas
- Papel pH.
- Papel mayordomo.
- Papel filtro.
- Papel encerado.

6.2.5 Computadora personal.

6.2.6 Impresora.

6.2.7 Material de oficina.

- Lapiceros.
- Corrector.
- Hojas papel Bond 80 g blanco.
- Tinta para impresora
- Lápices.
- Calculadora.

6.3 Métodos.

6.3.1 Diseño experimental:

Se llevó a cabo el estudio, usando la metodología para estudios de estabilidad dictada por la Comisión Guatemalteca de Normas en la Norma obligatoria guatemalteca para Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano. COGUANOR 11.01.04:04 (42) (Ver anexo Uno), con la única variante que no se determinó la concentración del principio activo, por la dificultad que plantea el hecho de que la concentración de un principio activo en un producto fitofarmacéutico no es constante por las variaciones que dan en las condiciones que fue cultivada, cosechada y procesada la materia prima, además no se conoce la totalidad de los principios activos contenidos en las especies utilizadas en este estudio, inclusive se desconoce quién es el principio activo.

6.3.2 Metodología:

Se procedió de la siguiente forma:

6.3.2.1 Materias primas:

- Se llevó a cabo la determinación botánica de las especies utilizada. Mediante la comparación con muestras de herbario y de acuerdo con la bibliografía adecuada para dicho efecto.
- Se llevó a cabo la determinación de las características físicas de cada una de las plantas/parte usadas como materias primas.
 - Porcentaje de Humedad
 - Cenizas totales
 - Porcentaje de residuos e impurezas.
- Se llevó a cabo la determinación de las Características microbiológicas de cada una de las plantas/parte usadas como materias primas.
 - Conteo aeróbico en placa
 - Mohos y levaduras
 - Análisis microbiológico sanitario
 - Coliformes totales
 - Coliformes fecales
 - *Escherichia coli*
- Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con los rangos aprobados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). (Ver sección de anexos.)

6.3.2.2 Producto terminado:

La metodología siguiente, se llevó a cabo a tiempo cero, a tiempo 30 días, 60 días y 90 días, en tres lotes piloto para cada una de las tinturas individuales así como en un lote de producto terminado. Se evaluará a 40 ± 2 °C y se evaluará el comportamiento de cada una de las tinturas individuales como el producto terminado.

- Se determinaron las características organolépticas de cada una de las tinturas.
 - Color.
 - Olor.

- Turbidez.
- Sedimentación.
- Formación de fases.

- Se determinaron las características físicas de cada una de las tinturas.
 - pH.
 - Densidad.
 - Grado alcohólico.

- Se determinaron las características microbiológicas de cada una de las tinturas.
 - Conteo aeróbico en placa.
 - Mohos y levaduras.
 - Actividad contra Enterobacterias.
 - Análisis microbiológico sanitario.
 - Coliformes totales.
 - Coliformes fecales
 - *Escherichia coli*.

- Se realizó la comparación de los resultados obtenidos con los valores establecidos por la OMS para este tipo de productos. (ver sección de anexos)

- Se estableció la Actividad contra Enterobacterias.

Se realizó en el Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

6.3.3 Análisis microbiológico:

6.3.3.1 Se llevó a cabo la determinación de coliformes generales o totales

- Procedimiento

- Se preparó el caldo lactosado según las instrucciones del envase.
 - Luego se agregó 9 mL de caldo lactosado en un tubo de 20 mL con tapón rosca, introducir una Campana de Durham. Prepara de esta forma los nueve tubos a utilizar.
 - Los tubos se esterilizaron en el autoclave, por 15 minutos a 250°C y 15 psi de presión.
 - Se dejó enfriar los tubos a temperatura ambiente.
 - Se pesó 2 g del material y agregarle 18 mL de agua estéril o 18 mL de solución salina al 0.85% p/v.
 - Fue agitado de tal manera que el agua entre en contacto con toda la superficie de la muestra.
 - Se dejó reposar por 1 hora exacta (medir con cronómetro), tapar con papel aluminio para evitar contaminación.
 - Luego de esto fue filtrada la solución con un embudo de vidrio y algodón previamente esterilizados.
 - Se inocularon, los tres primeros tubos de caldo lactosado agregando 1 mL del filtrado, a los siguientes tres, 0.1 mL y los últimos tres, 0.01 mL del filtrado.
 - Se incubó de 24 a 48 horas en la incubadora # 1 a 35-37°C.
 - Se verificó el crecimiento bacteriano con producción de gas (burbuja de aire en la campana de Durham), formación de turbidez. y precipitado.
 - La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a la tabla de Número Más Probable (NMP).
 - Los tubos que dieron resultado positivo fueron separados para hacerles análisis de Coliformes fecales
- Expresión de resultados
 - La presencia de Coliformes totales indica que la contaminación de la muestra se debe al proceso que ha llevado desde el inicio, como malas condiciones de secado, almacenamiento, aire, humedad así contaminación por animales, insectos y agua. (1)

Muestra	1: 100	1:1000	1:10000	Resultado (NMP/g-mL)
XX	0	0	0	Xx

6.3.3.2 Determinación de coliformes fecales:

- Procedimiento
 - Se preparó el caldo Bilis Verde Brillante (BVB) según las instrucciones del envase.
 - Se agregó 9 mL de caldo BVB en un tubo de 20 mL con tapón rosca, introducir una
 - Campana de Durham. Fueron esterilizadas junto con los tubos a utilizar.
 - Los tubos fueron esterilizados en el autoclave, por 15 minutos a 250°C y 15 psi de presión.
 - Fueron enfriados a temperatura ambiente.
 - En la campana limpia y sanitizada con anterioridad se inocularon los tubos de BVB tomando una asada de cada tubo de caldo lactosado que presento gas.
 - Estos tubos fueron incubados de 24 a 48 horas en la incubadora # 2 a 42-44°C.
 - Se verificó el crecimiento bacteriano con producción de gas (burbuja de aire en la campana de Durham), formación de turbidez. y precipitado.
 - Los resultados fueron analizados respecto a la tabla de Número Más Probable (NMP).
 - A los tubos que dieron resultado positivo hacerle análisis de *Escherichia coli*.

- Expresión de resultados
 - La presencia de Coliformes fecales indica contaminación fecal proveniente del riego con aguas negras y puede haber potencialmente la presencia de microorganismos patógenos.

Muestra	1: 100	1:1000	1:10000	Resultado (NMP/g-mL)
XX	0	0	0	xx

6.3.3.3 Determinación de *Escherichia coli*

- Procedimiento
 - Se preparó el caldo *Escherichia coli* según las instrucciones del envase.
 - Se agregaron 10 ml de caldo *Escherichia coli* en un tubo de 20 mL con tapón rosca, luego se introdujo una campana de Durham.
 - Los tubos fueron esterilizados en el autoclave, por 15 minutos a 250°C y 15 psi de presión.
 - Se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
 - Se inocularon los tubos de caldo *Escherichia coli* tomando una asada de cada tubo de caldo BVB que presento gas.
 - Se incubó de 24 a 48 horas en la incubadora # 1 a 35-37°C.
 - Se verificó el crecimiento bacteriano mediante la producción de gas (burbuja de aire en la campana de Durham), formación de turbidez. y precipitado.
 - Los tubos que dieron positivo fueron inoculados en placas de agar MacConkey.
 - Dichas cajas fueron incubadas a 43-45°C durante 18- 24 horas.
 - El crecimiento de colonias rojas, umbilicadas, generalmente no mucosas, indicaron la posible presencia de *Escherichia coli*.

- Expresión de resultados
 - *Escherichia coli* se presenta como un microorganismo enteropatógeno.
 - (1). El producto es aceptado cuando no presenta crecimiento microbiológico.

Muestra	Resultado
XX	Positivo o Negativo

6.3.3.4 Conteo aeróbico en placa y análisis de mohos y levaduras.

- Procedimiento
 - Para bacterias mesófilas

Preparación de la muestra

 - Se midió 1 g o 1 mL de la muestra y se adicionó 9 ml de agua peptonada o solución salina al 0.85% p/v
 - Se agitó para obtener una mezcla homogénea.
 - A partir de la dilución anterior, fueron preparadas las diluciones subsiguientes las cuales debían depender del número sospechado de microorganismos presentes.
 - Se tomó 1 ml de la solución 1:10 y se agregó la a 9 mL de agua peptonada o solución salina al 0.85% p/v
 - Se tomó 1 mL y se procedió conforme lo descrito anteriormente, hasta llegar a la dilución 1:10000.
 - Se colocó 0.1 mL de cada una de las diluciones en 3 cajas de Petri estériles de 9 – 10 cm de diámetro previamente preparadas e incubadas con agar Plate count.
 - Se incubó a 35-37 °C durante 5 días.
 - Para mohos y levaduras

Preparación de la muestra

- Se midió 1 g o 1 mL de la muestra y adicionar 9 mL de agua peptonada o solución salina al 0.85% p/v
 - Se agitó para obtener una mezcla homogénea.
 - A partir de la dilución anterior, se hicieron las diluciones subsiguientes las que dependían del número sospechado de microorganismos presentes.
 - Se tomó 1 ml de la solución 1:10 y luego se agregó a 9 mL de agua peptonada o solución salina al 0.85% p/v
 - De esta se tomó 1 mL y se procedió conforme lo descrito anteriormente, hasta llegar a la dilución 1:10000.
 - Se colocó 0.1 mL de cada una de las diluciones en tres cajas de Petri estériles de 9 – 10 cm de diámetro previamente preparadas e incubadas con agar Sabouraud.
 - Se incubó a 20-25 °C durante 5 días.
- Expresión de resultados

Cálculos:

Cajas sin crecimiento bacteriano: El resultado se expresó como menor de la dilución más baja sembrada (4).

$$\begin{array}{rcccl}
 \text{Ej:} & 1:10 & 1:100 & & \\
 & 0 & 0 & = & 1 \cdot 10 \text{ UFC / g ó mL} \\
 & 0 & 0 & &
 \end{array}$$

Cajas con menos de 25 colonias: Se tomó la dilución menor y reportar como recuento aeróbico en placa estimado; o tomar como 25 veces la dilución menor donde aparecen colonias.

$$\begin{array}{rcccl}
 \text{Ej:} & 1:10 & 1:100 & & \\
 & 15 & 3 & = & 250 \text{ UFC/g ó mL} \\
 & 0 & 0 & &
 \end{array}$$

Cajas entre 25 y 250 colonias: El conteo final se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{Sumatoria de Colonias}}{(1 \cdot \text{NCdb}) + (0.1 \cdot \text{NCda})} \cdot \text{FD}$$

N: Número de colonias por g o mL de muestra.

NCdb: Número de cajas contadas de la dilución más baja.

NCda: Número de cajas contadas de la dilución siguiente más alta.

FD: Factor de dilución menor contada.

Ej: 1:100	1:1000
232	33
244	28

$$\frac{232+244+33+28}{[(1*2) + (0.1*2)]} * 100 = 24,409 = \mathbf{24,000 \text{ UFC/g ó mL}}$$

NOTA: Cuando los conteos de uno de los duplicados está fuera de ambos límites (25-250), tomar en cuenta sólo los que están dentro de los establecidos.

Todas las cajas tienen más de 250 colonias:

Se seleccionaron los duplicados de la dilución con el conteo más cercano a 250.

Si hay menos de 10 colonias por cada cuadro del contador de colonias (cada cuadro mide 1 cm²), seleccionar 12 cuadros (seis horizontales y seis verticales). Si hay más de 10 colonias por cuadro, entonces contar solo 4 cuadros. En ambos casos se debe obtener el promedio de colonias por cm². Este resultado se multiplica por el área de La caja y por el factor de dilución y se informa como recuento estimado, el cual se Indica con un asterisco (*). El diámetro interno del las de tamaño estándar varía, por lo que el área puede ser:

65 cm (9 cm de diámetro interno)

57 cm (8.5 cm de diámetro interno)

Ejemplo:

Cada cm² tiene más de 10 colonias:

$$\text{Promedio} = 15+16+18+15 = 64/4 = 16$$

$$\text{RE} = 16 * 57 a * 100b = 91,200 \text{ UFC/ g-mL}$$

RE = Recuento estimado

a = Área de la caja

b = Factor de dilución

Cajas con crecimiento excesivo: El conteo excede de 100 colonias por cm^2 o es muy numeroso para contar (MNPC). Se informa como recuento estimado y como mayor de 5700 UFC

Ej: 1:1000 1:10000

MNPC MNPC

$$100 a * 57b * 10000c = 5,700,000 \text{ UFC/g ó mL}$$

MNPC = Muy numeroso para contar

a = Colonias

b = Área de la caja

c = Factor de dilución mayor (15)

6.3.4 Análisis Físicoquímico Organoléptico

6.3.4.1 Determinación de características organolépticas:

Se tomó una muestra de 10 mL en un tubo de ensayo, se verificó el color de la tintura: para este análisis se contó con un panel de cinco personas, las cuales compararon el color que observan con un catálogo de colores Pantone® durante cada uno de los tiempos de muestreo.

6.3.4.2 Determinación de pH:

Se tomó una cantidad de muestra en un tubo de ensayo de 100 mL, la cual fue analizada por potenciometría.

6.3.4.3 Determinación de densidad relativa:

Se tomar un picnómetro previamente lavado y secado, se pesó y anotó el peso exacto del mismo. Fue llenado el picnómetro con agua destilada y se estableció el peso exacto del mismo. Se lavó el picnómetro con acetona para eliminar toda el agua que pudo haber quedado adherida a las paredes, Se llenó el picnómetro con la muestra, se estableció el peso exacto. Una vez determinados todos los pesos, se procedió con la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad relativa} = \frac{(\text{Peso del picnómetro con muestra}) - (\text{Peso del picnómetro vacío})}{(\text{Peso del picnómetro con agua}) - (\text{Peso del picnómetro vacío})}$$

6.3.4.4 Determinación de actividad:

Sirve para confirmar la actividad antimicrobiana de la tintura. Se usó una metodología basada en la prueba de Mitscher *et al.* (19) que consiste en: agregar un mL de la tintura a nueve mL de agar Müller Hinton (AMH-T) fundido a 40°C, agitar, verter en una caja de petri y dejar solidificar. Incubar a 35°C durante 24 horas, las placas estériles se deben guardar a 4°C. Se inocularon bacterias estándar en caldo tripticasa y se incubaron a 34°C durante un día, luego se diluyeron uno en diez en agua destilada estéril y se inocularon en triplicado por estrías en la caja de AMH-T (17). Se incubó a 35°C durante un día y se leyó. Las bacterias fueron inhibidas a la concentración de prueba..

6.3.4.5 Determinación de grado alcohólico:

Para productos que no contienen sustancias volátiles, ni sustancias ácidas resinosas, se tomó una muestra de ensayo a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, se transfirió 25 mL a un balón de destilación de 500 mL. Se añadieron 150 mL de agua y algunas perlas de ebullición y se conecta el condensador, se verificó que la unión estuviera bien sellada.

Se destilaron 90-95 mL recogiendo el destilado en un matraz volumétrico de 100 mL, el cual se encontraba sumergido en un baño de hielo. Se llevó la temperatura del destilado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y se completó el volumen con agua enfriada a la misma temperatura.

Se mezcló bien. Se determinó la densidad relativa de la solución a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, empleando un picnómetro con termómetro.

$$D_{20}^{20} = (m_2 - m_1) / (m_1 - m)$$

Donde:

M₂ es el peso del picnómetro con la muestra de ensayo.

M₁ es el peso del picnómetro con agua

M es el peso del picnómetro vacío

Se determinó el porcentaje de alcohol etílico en la muestra según la tabla No. 1. El resultado se aproxima hasta la centésima y se informa el por ciento de alcohol etílico.(16)

Tabla No. 1
Equivalencia de densidad relativa a 20°C y porcentaje de alcohol

Densidad Relativa a 20°C	% de Etanol (v/v)	Densidad Relativa a 20°C	% de Etanol (v/v)	Densidad Relativa a 20°C	% de Etanol (v/v)
0.9710	95.93	0.9810	59.09	0.9910	25.33
0.9715	94.12	0.9815	57.28	0.9915	24.01
0.9720	92.32	0.9820	55.48	0.9920	22.49
0.9725	90.49	0.9825	53.71	0.9925	20.99
0.9730	88.66	0.9830	51.94	0.9930	19.50
0.9735	86.81	0.9835	50.19	0.9935	18.04
0.9740	84.96	0.9840	48.45	0.9940	16.59
0.9745	83.11	0.9845	46.73	0.9945	15.15
0.9750	81.26	0.9850	45.02	0.9950	13.71
0.9755	79.39	0.9855	43.32	0.9955	12.01
0.9760	77.53	0.9860	41.62	0.9960	10.89
0.9765	75.67	0.9865	39.95	0.9965	09.49
0.9770	73.82	0.9870	38.28	0.9970	08.10
0.9775	71.96	0.9875	36.63	0.9975	06.74
0.9780	70.10	0.9880	34.99	0.9980	05.38
0.9785	68.24	0.9885	33.37	0.9985	04.03
0.9790	66.38	0.9890	31.76	0.9990	02.68
0.9795	64.55	0.9895	30.19	0.9995	01.34
0.9800	62.72	0.9900	28.62	1.000	00.00
0.9805	60.90	0.9905	27.07		

(16)

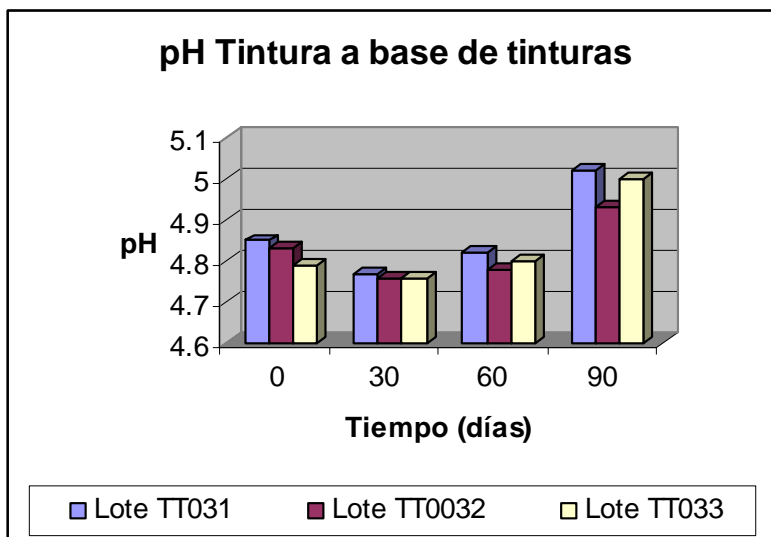
7. RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo con la Norma Obligatoria Guatemalteca para Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano. COGUANOR 11.01.04:04 (42), los parámetros a tomar en cuenta para la evaluación de la estabilidad de una solución son los siguientes: pH, límites microbianos, características organolépticas (color, suspendibilidad) y concentración del principio activo; es importante mencionar que en este caso al tratarse de un producto fitofarmacéutico, la cantidad de principio activo no se puede cuantificar por las variaciones que dan en las condiciones que fue cultivada, cosechada y procesada la materia prima, además no se conoce la totalidad de los principios activos contenidos en las especies utilizadas en este estudio, incluso se desconoce a ciencia cierta que sustancias son las que ejercen los efectos terapéuticos.

El presente trabajo se dividió en dos fases, esto debido a que en el momento de presentar el anteproyecto se dio un cambio a nivel de la normativa que rige los estudios de estabilidad; se realizó el mismo usando los dos procedimientos descritos por las normativas uno a tres meses (el antiguo) y otro a seis meses (el nuevo). Se trabajó en una cámara de estabilidad con temperatura de 40°C y 70% de humedad relativa de acuerdo con lo descrito en la norma y se evaluó dos tipos de tinturas del mismo producto, una preparada a partir de la mezcla de las materia prima cruda (partes de plantas) y otra preparada con una mezcla de las tinturas de cada materia prima preparada de forma separada, esto para evaluar si existe alguna variación en la estabilidad del producto debida a la forma en que el mismo fue preparado. La variación en color fue evaluada mediante la elección de un panel de 5 personas las cuales compararon el color de la tintura de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos contra un catalogo de colores Pantone®. El pH fue medido potenciométricamente y de acuerdo a la metodología establecida.

Se inicia esta discusión con los resultados obtenidos en la fase I del proceso que fue a 90 días:

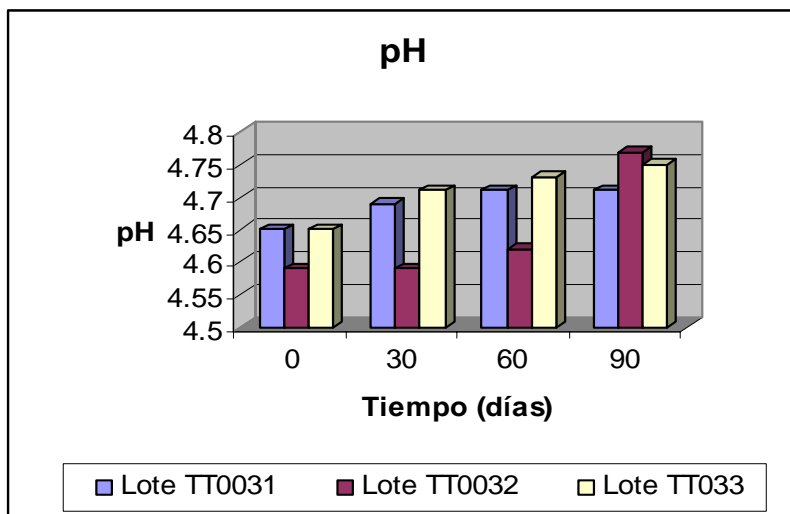
Gráfico No. 1
pH de tintura a base de tinturas



Fuente: Datos experimentales

Como se observa en el gráfico 1 el valor de pH tuvo en los primeros treinta días una pequeña disminución no mayor de 0.1 luego se da un aumento en los valores durante todo el período restante, el aumento total de pH no es mayor de 0.3 iniciando en valores cercanos a 4.8 en el tiempo cero y cercanos a 5.00 final de los 90 días en los tres lotes de cada tintura que se ingresaron a la cámara.

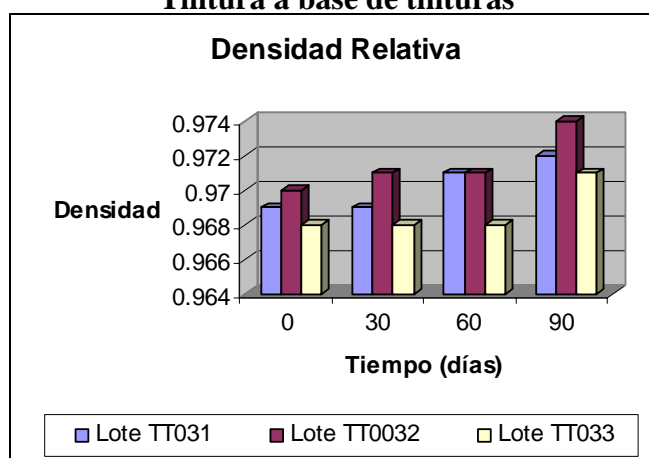
Gráfico No. 2
pH de tintura a base de plantas



Fuente: Datos experimentales

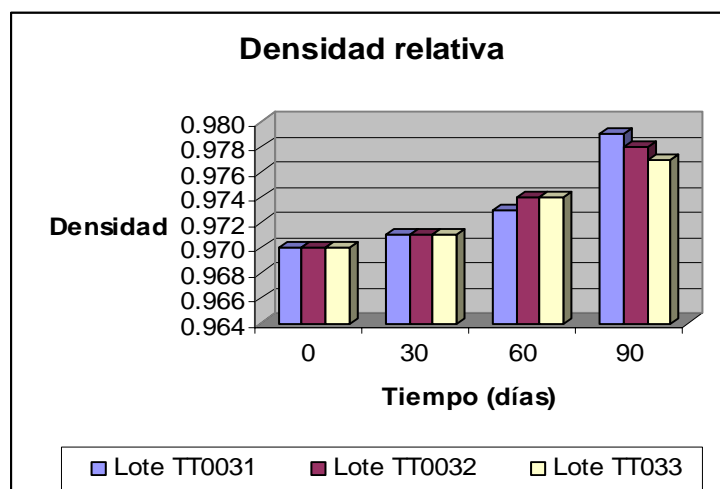
En el caso de la tintura preparada a partir de la mezcla de plantas, el pH fue aumentando de manera constante al igual que para la tintura a base de tinturas, aunque el incremento fue un tanto menor, inició con valores entre 4.6 y 4.65 y finalizó con valores entre 4.7 y 4.8; como se puede observar el cambio de pH en esta tintura se comportó de manera similar a la evaluada anteriormente y dicho aumento no queda fuera del rango de las especificaciones del producto. Por lo tanto en el caso del pH en las tintura preparadas a base de plantas y tinturas individuales, se concluye que son estables luego de 90 días a condiciones de temperatura y humedad extremas.

Gráfico No. 3
Tintura a base de tinturas



Fuente: Datos experimentales.

Gráfico No. 4
Tintura a base de plantas



Fuente: Datos experimentales.

La densidad relativa en la tintura preparada a partir de tinturas aumento durante los primeros 30 días del estudio, luego se estabilizó entre los 30 y 60 días, para aumentar finalmente entre los 60 y 90 días; en el caso de la que se preparó a partir de la mezcla de plantas, el aumento fue constante durante los 90 días y fue un tanto mayor que la otra tintura, sin embargo se puede establecer que la tendencia en las dos fue de aumento sin sobrepasar los rangos establecidos por la especificación del producto. El aumento en la densidad esta relacionado con la evaporación que sufre el alcohol contenido en la tintura, sumado a que las tinturas preparadas a partir de productos naturales tienden a formar sedimentos los cuales afectan sensiblemente a la densidad, como se observa en ambos casos en el tiempo 90, tiempo en el cual se detectó presencia de sedimentos en las tinturas (ver tabla No. 3) y se vio un aumento considerable en la densidad relativa de las tinturas.

Tabla No. 1
Sedimentación tintura a base de tinturas

Tiempo	Lote TT031	Lote TT032	Lote TT033	Fecha
0	0	0	0	13-11-2006
30	0	0	0	13-12-2006
60	0	0	0	12-01-2007
90	+	+	+	13-02-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 2
Sedimentación tintura a base de plantas

Tiempo	Lote TT031	Lote TT032	Lote TT033	Fecha
0	0	0	0	13-11-2006
30	0	0	0	13-12-2006
60	0	0	0	12-01-2007
90	+	+	+	13-02-2007

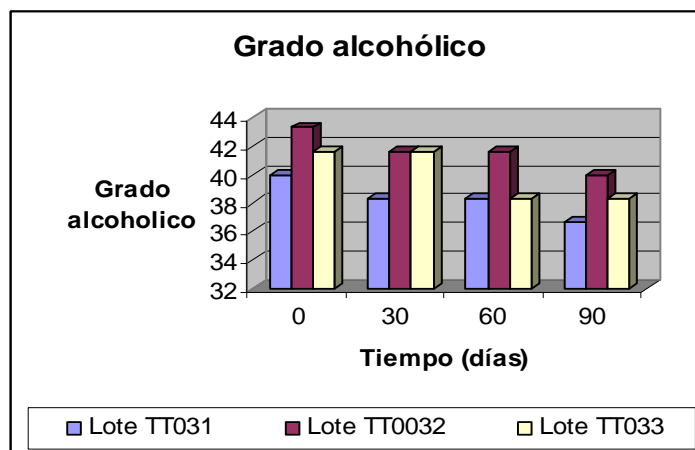
Fuente: Datos experimentales.

En el caso de la sedimentación, como se observa en las tablas 1 y 2 respectivamente en ambas tinturas se pudo observar que la cantidad de sedimentos aumentó en el período comprendido entre los 60 y 90 días; en la tintura preparada a base de la mezcla de plantas, la sedimentación fue aumentando gradualmente conforme pasaba el tiempo, ausente a tiempo 30, poca a tiempo 60 y ligera a 90 días mientras que en la

tintura a base de tinturas ausente a tiempo 30 y 60, ligera a 90 días; esta presencia de sedimentos es común en los productos fitoterapéuticos y ha tomado en cuenta dentro de las especificaciones las cuales indican que debe ser de ausente a ligera, de aquí se establece que las tinturas son estables y la cantidad de sedimentos no sobrepasan lo establecido en las especificaciones del producto.

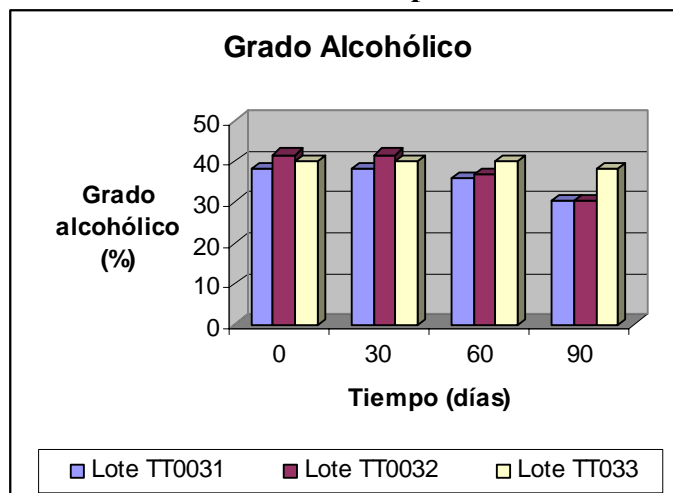
La tintura es una forma farmacéutica que utiliza alcohol al 30% para la extracción de las sustancias activas de las plantas, lo cual hace que este sea un componente principal y el cual debe estar en el rango de 30% a 40% del contenido. Para este trabajo, el grado alcohólico se calculó mediante el método de destilación simple, en el cual se toma una muestra, se destila y al destilado se le calcula la densidad relativa y dicho valor se compara con la tabla establecida por la bibliografía. (16)

Gráfico No. 5
Tintura a base de tinturas



Fuente: Datos experimentales.

Gráfico No. 6
Tintura a base de plantas



Fuente: Datos experimentales.

Los resultados obtenidos para el grado alcohólico de las tinturas evaluadas, mostró para ambas tinturas, una disminución gradual de la cantidad de alcohol contenida en los productos, para la tintura preparada en base a tinturas, la disminución no fue tan dramática, quedando los valores de los tres lotes analizados dentro del rango definido por la especificación; para la tintura preparada a base de plantas, la disminución fue gradual, este proceso se justifica por la evaporación gradual que tiene el alcohol debido a la exposición a alta temperatura presente en la cámara.

Tabla No. 3
Color Tintura a base de tinturas

Tiempo	Lote TT0031	Lote TT0032	Lote TT0033	Fecha
0	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	13-11-2006
30	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	13-12-2006
60	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	12-01-2007
90	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	Pantone® 456C	13-02-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 4
Color tintura a base de plantas

Tiempo	Lote TP031	Lote TP032	Lote TP033	Fecha
0	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	13-11-2006
30	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	13-12-2006
60	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	12-01-2007
90	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	13-02-2007

Fuente: Datos experimentales.



Pantone® 456C



Pantone® 3985C

El color en una tintura es un indicador del grado de oxidación que los componentes de la misma; la tintura preparada a base de tinturas presentó cambio de color sólo en la última medición a los 90 días mientras que la tintura preparada a partir de la mezcla de plantas no presentó cambio de color, sería necesario realizar más pruebas al respecto para comprobar si existe alguna relación entre preparar las tinturas de forma separada y un aumento en el grado de oxidación de los componentes de la tintura.

Tabla No. 5
Análisis microbiológico

Tiempo	Recuentos Totales	<i>E. coli</i>	Hongos y levaduras	<i>Salmonella sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-11-2006
30	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-12-2006
60	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	12-01-2007
90	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-02-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 6
Análisis microbiológico

Tiempo	Recuentos Totales	<i>E. coli</i>	Hongos y levaduras	<i>Salmonella sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-11-2006
30	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-12-2006
60	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	12-01-2007
90	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-02-2007

Fuente: Datos experimentales.

Se realizó el análisis microbiológico para las dos tinturas que se ensayaron, para ambos casos no hubo crecimiento de ningún tipo de microorganismo, en ninguna de las muestras analizadas en ninguno de los tiempos de análisis, esto puede estar relacionado con el alto contenido de alcohol de la tintura, lo cual no permite el crecimiento de los mismos.

Otra prueba realizada fue la de actividad contra enterobacterias, para esto se utilizaron cepas de *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 del departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, las pruebas se realizaron para cada uno de los 3 lotes de cada tintura a una concentración de 100 mg/mL. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla No. 7
Actividad inhibitoria
Tintura a base de tinturas 100mg/mL

Tiempo	<i>Salmonella typhi.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-11-2006
30	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-12-2006
60	Inhibida	Inhibida	Inhibida	12-01-2007
90	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-02-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 8
Actividad inhibitoria
Tintura a base de plantas 100mg/mL

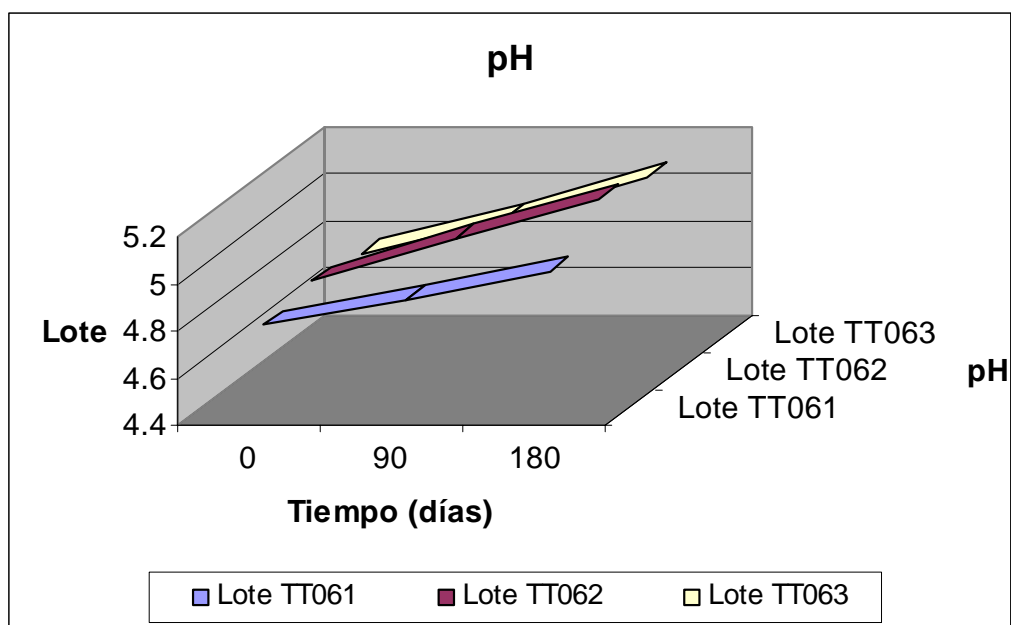
Tiempo	<i>Salmonella typhi.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-11-2006
30	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-12-2006
60	Inhibida	Inhibida	Inhibida	12-01-2007
90	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-02-2007

Fuente: Datos experimentales.

Para ambas tinturas, no hubo crecimiento de ninguno de los microorganismos involucrados lo que indica que la actividad contra enterobacterias no se ve afectada en ninguno de los tiempos de prueba.

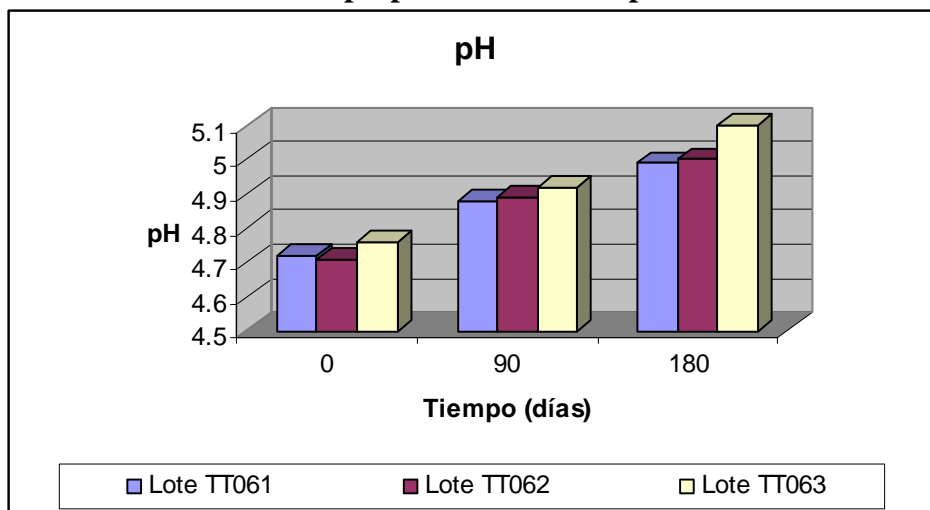
La segunda fase del estudio se realizó a 180 días, bajo las condiciones establecidas por la nueva normativa, los resultados fueron los siguientes:

Gráfico No. 7
Tintura a base de tinturas



Fuente: Datos experimentales.

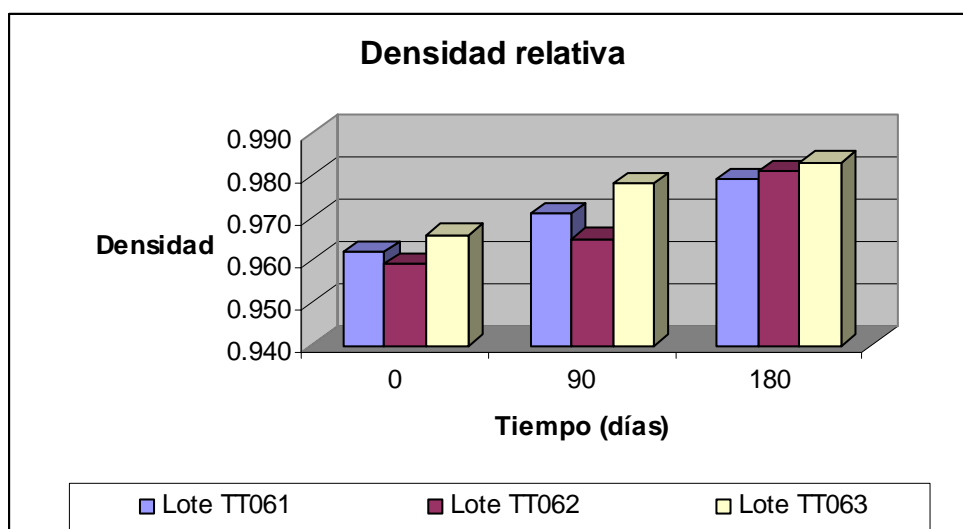
Gráfico No. 8
Tintura preparada a base de plantas



Fuente: Datos experimentales.

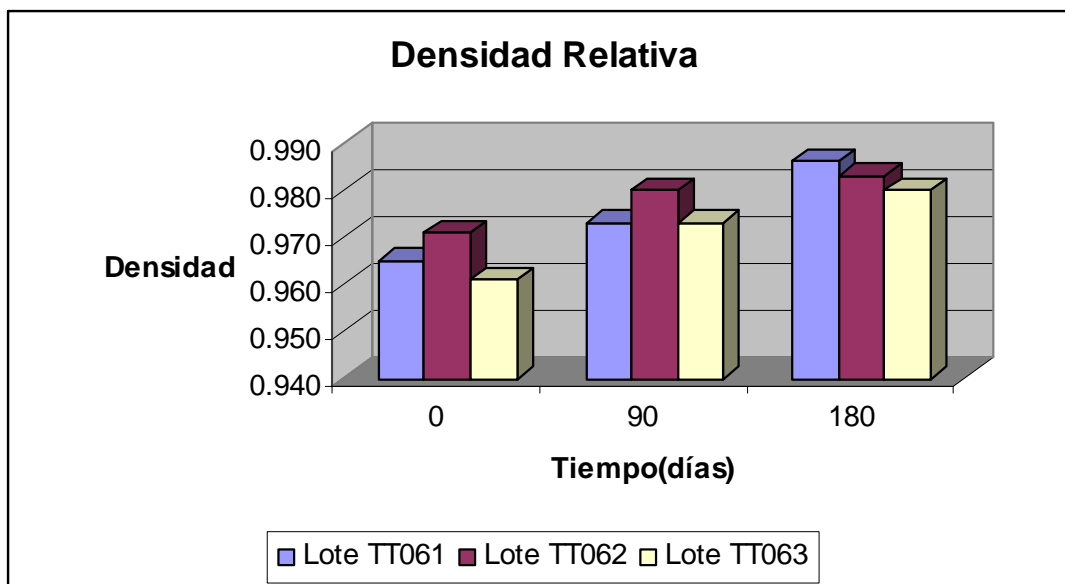
En este caso, las dos tinturas se comportaron de la misma forma: se dio un aumento gradual desde el tiempo cero hasta el tiempo 180 como se puede observar en los gráficos 8 y 9, sin llegar estos a estar fuera del rango establecido para el producto; otro factor importante de mencionar es que los valores no estuvieron por encima de los valores obtenidos en el estudio a 90 días sino que mantuvieron valores similares lo cual habla bien de la estabilidad del producto.

Gráfico No. 9
Tintura preparada a base de tinturas



Fuente: Datos experimentales.

Gráfico No. 10
Tintura preparada a base de plantas



Fuente: Datos experimentales

La densidad relativa en el estudio a 180 días se comportó de manera semejante para las dos tinturas, el aumento fue gradual y sin llegar a estar fuera del rango establecido por la especificación del producto, el aumento fue cercano a 0.2 g y estuvo relacionado con un aumento de la sedimentación del producto como se puede observar en las tablas 9 y 10 en las cuales se observa que para el tiempo 90 la sedimentación fue muy leve mientras que para el tiempo 180 estaba presente de manera ligera y este factor fue fundamental para el aumento de la densidad del producto; este comportamiento fue similar tanto en la tintura preparada a partir de tinturas y la preparada a partir de la mezcla de plantas. Ambas tinturas se comportaron de manera similar al observado en el estudio a 90 días y el grado de sedimentación fue el mismo en ambos estudios al tiempo 90, lo que indica que los niveles de degradación de los componentes y formación de sedimentos debidos a este factor es el mismo sin importar la fuente a partir de la cual fue preparada la tintura.

Tabla No. 9
Sedimentación
Tintura a base de tinturas

Tiempo	Lote TT061	Lote TT062	Lote TT063	Fecha
0	0	0	0	13-11-2006
90	+	+	+	13-02-2007
180	++	++	++	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 10
Sedimentación
Tintura a base de plantas

Tiempo	Lote TT061	Lote TT062	Lote TT063	Fecha
0	0	0	0	13-11-2006
90	+	+	+	13-02-2007
180	++	++	++	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.

El color presentó variación a los 90 días en ambas tinturas, llegando a un tono más oscuro, el cual se mantuvo hasta el tiempo 180 sin variación. Lo que indica que los procesos de oxidación llegan al máximo a los 90 días para luego tornarse un poco más lentos y estabilizarse.

Tabla No. 11
Tintura preparada a base de tinturas
Color

Tiempo	Lote TT0061	Lote TT0062	Lote TT0063	Fecha
0	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	13-11-2006
90	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	13-02-2007
180	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 12
Tintura preparada a base de plantas
Color

Tiempo	Lote TT0061	Lote TT0062	Lote TT0063	Fecha
0	Pantone® 456C	Pantone® 456C	Pantone® 456C	13-11-2006
90	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	13-02-2007
180	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	Pantone® 3985C	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.



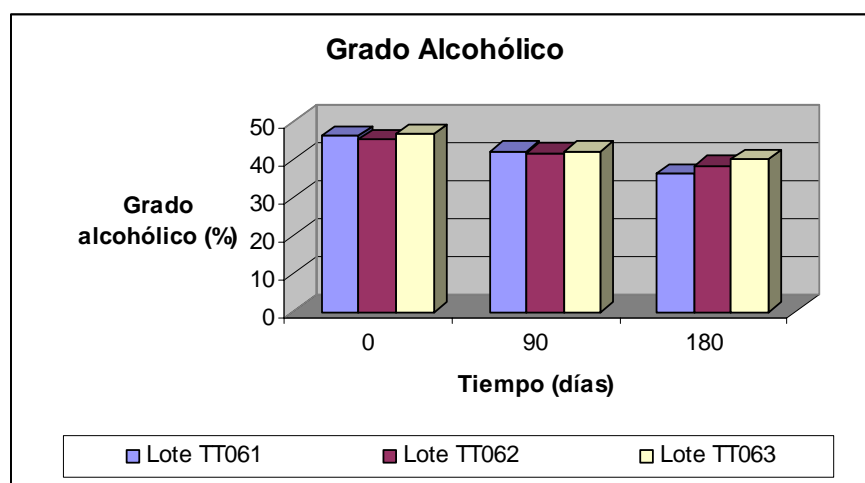
Pantone® 456C



Pantone® 3985C

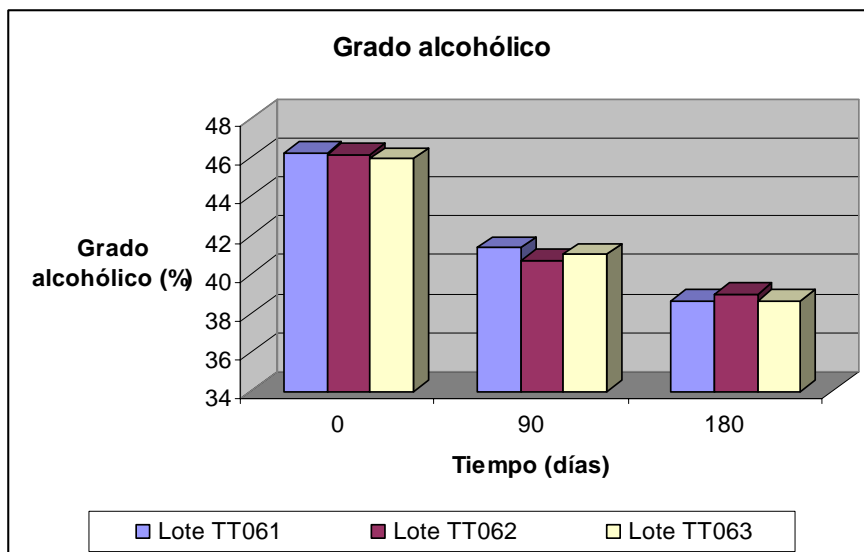
El grado alcohólico fue disminuyendo de manera gradual pero sin llegar a estar por debajo de los valores indicados por la especificación, las dos tinturas se comportaron de manera similar, aunque la tintura preparada a partir de la mezcla de plantas presentó una disminución levemente mayor que la tintura preparada a base de tinturas individuales como se puede observar en los gráficos once y doce.

Gráfico No. 11
Tintura preparada a base de tinturas



Fuente: Datos experimentales.

Gráfico No. 12
Tintura preparada a base de plantas



Fuente: Datos experimentales

El análisis microbiológico sanitario arrojó los siguientes resultados:

Tabla No. 13
Análisis microbiológico
Tintura a base de tinturas

Tiempo	Recuentos Totales	<i>E. coli</i>	Hongos y levaduras	<i>Salmonella sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-11-2006
90	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-02-2007
180	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 14
Análisis microbiológico
Tintura a base de plantas

Tiempo	Recuentos Totales	<i>E. coli</i>	Hongos y levaduras	<i>Salmonella sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-11-2006
90	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	13-02-2007
180	< 10 UFC/g	Ausente	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.

Como se observa en las Tablas 13 y 14, tanto en la tintura preparada a partir de tinturas individuales como en la preparada a partir de plantas, no hubo crecimiento de microorganismos en la prueba para recuentos totales, en la de organismos patógenos y en la de hongos y levaduras. Esto es consistente con los resultados obtenidos en el estudio a 90 días y está relacionado con el alto contenido de alcohol del producto, lo que inhibe el crecimiento de los microorganismos mencionados.

Tabla No. 15
Actividad inhibitoria
Tintura preparada a base de tinturas 100mg/mL

Tiempo	<i>Salmonella typhi.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-11-2006
9	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-02-2007
180	Inhibida	Inhibida	Inhibida	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 16
Actividad inhibitoria
Tintura preparada a base de plantas 100mg/mL

Tiempo	<i>Salmonella typhi.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Fecha
0	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-11-2006
9	Inhibida	Inhibida	Inhibida	13-02-2007
180	Inhibida	Inhibida	Inhibida	14-05-2007

Fuente: Datos experimentales.

Con respecto a la prueba de actividad inhibitoria de enterobacterias, se utilizaron los mismo organismos que los utilizados en el estudio a 90 días, los resultados obtenidos fueron similares, no hubo crecimiento de los microorganismos que se utilizaron; esto indica que a pesar que el tiempo de prueba en el estudio a 180 días fue mayor, este factor no influyó en la capacidad inhibitoria de la tinturas en estudio. La inhibición fue completa para las dos tinturas estudiadas, ver tabla 15 y 16.

Tabla No. 17
Actividad inhibitoria
Tintura preparada a base de plantas tiempo 180 días

Microorganismo	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/ mL
<i>Salmonella typhi</i>	Inhibido	Inhibido	Crecimiento (+)	Crecimiento (++)	Crecimiento (+++)
<i>E. coli</i>	Inhibido	Inhibido	Crecimiento (+)	Crecimiento (+++)	Crecimiento (++++)
<i>S. aureus</i>	Inhibido	Inhibido	Inhibido	Crecimiento (+)	Crecimiento (++)

Fuente: Datos experimentales.

Tabla No. 18
Actividad inhibitoria
Tintura preparada a base de plantas tiempo 180 días

Microorganismo	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/ mL
<i>Salmonella typhi</i>	Inhibido	Inhibido	Crecimiento (+)	Crecimiento (++)	Crecimiento (+++)
<i>E. coli</i>	Inhibido	Inhibido	Crecimiento (+)	Crecimiento (+++)	Crecimiento (++++)
<i>S. aureus</i>	Inhibido	Inhibido	Inhibido	Crecimiento (+)	Crecimiento (++)

Fuente: Datos experimentales.

Con las tinturas luego de 180 días a condiciones experimentales, se realizó la prueba de concentración inhibitoria mínima, para la cual como se observa en las tablas 17 y 18 se utilizaron 5 concentraciones de agar extracto; como se observa, las dos tinturas se comportaron de manera similar para los microorganismos *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* a una concentración de 25 mg/mL se presentó crecimiento el cual aumento a concentraciones de 10 y 5 mg/mL, para *S. aureus* el crecimiento se presentó a 10mg/ mL para las dos tinturas; de aquí se puede inferir que la concentración inhibitoria mínima no se ve afectada por la forma en que se preparó la tintura, ya sea a partir de la mezcla de tinturas individuales ni en la tintura preparada a partir de plantas, y que a pesar de las condiciones extremas a las que se lleva a ambas tinturas durante el estudio la actividad antimicrobiana de la tintura no es afectada de forma significativa y muestra

estabilidad. Sin embargo es necesario ampliar los estudios a este respecto. Se propone el uso de esta metodología siguiente para evaluar la estabilidad de este tipo de productos: en primer lugar evaluar la presencia de actividad a una concentración determinada por ejemplo 100mg / mL; una vez establecida esta se procede de la misma forma con la diferencia de que se va disminuyendo gradualmente la concentración del producto a evaluar, de tal forma que se pueda establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) del producto a un tiempo determinado y se compara contra una tintura preparada recientemente y establecer la relación existente entre las condiciones de un estudio de estabilidad y la actividad antimicrobiana del producto a analizar.

Una vez completados los dos estudios y de acuerdo con los resultados obtenidos, no hubo variación en cuanto a los valores obtenidos para los diferentes análisis tanto fisicoquímicos como microbiológicos entre las dos tinturas evaluadas, además los resultados fueron similares para ambos estudios en los tiempos en los que había traslape, esto demuestra que la tintura preparada a partir de plantas como la tintura preparada a partir de tinturas son estables fisicoquímica como microbiológicamente y que ambos procedimientos experimentales son válidos, además la actividad inhibitoria no se vio afectada y la concentración inhibitoria mínima fue similar en ambas tinturas para los 3 microorganismos utilizados.

8. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los valores de pH, densidad relativa, grado alcohólico, sedimentación y color obtenidos en el estudio a 90 y 180 días, tanto para la tintura preparada en base a plantas como en la preparada a partir de tinturas, se establece que estas son estables y que sus características fisicoquímicas no se ven alteradas de forma que pongan en riesgo el producto.
2. De acuerdo con los resultados del análisis microbiológico sanitario, para la tintura preparada en base a plantas como en la preparada a partir de tinturas en estudios realizados a 90 y 180 días conforme la normativa de estudios de estabilidad vigente y la normativa anterior, se establece que estas son estables y no presentan crecimiento de microorganismo alguno que ponga en riesgo el producto.
3. La estabilidad de las tinturas en cuanto a su actividad contra enterobacterias no se vio afectada luego de realizado el estudio de estabilidad a 90 y 180 días.
4. No existió diferencia en cuanto a resultados entre el estudio a 90 y a 180 días, los resultados tanto de las características fisicoquímicas como microbiológicas fueron similares y no hubo contradicción entre ellos, lo que demuestra validez para ambas metodologías aunque el estudio a 180 días permite hacer una comparación a un tiempo mayor, lo cual es conveniente para evaluar el comportamiento del producto a un lapso de tiempo mayor.
5. Luego de analizar las tinturas, la concentración inhibitoria mínima para ambas tinturas fue de 25 mg/mL para los microorganismos *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* y 10 mg/mL para *S. aureus*. De aquí se concluye que ambas tinturas se comportan de manera similar y que no hay inferencia en la estabilidad de la capacidad inhibitoria de la tintura basándose en las condiciones a las que fue sometida la tintura y en la forma que se prepara la tintura, ya sea a partir de la mezcla de tinturas de plantas individuales o la mezcla de las plantas y que la ambas tinturas.

6. De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de actividad antimicrobiana, se establece que éste parámetro es el más importante a evaluar en este tipo de producto, debido a la acción farmacológica que se plantea para el mismo. Siendo el procedimiento para establecer la concentración inhibitoria mínima del producto el más adecuado para determinar la estabilidad de la tintura en términos de su actividad biológica.

9. RECOMENDACIONES

1. Todas las materias primas deben ser analizadas microbiológicamente para evitar la contaminación en el proceso de fabricación.
2. Se deben utilizar materias primas de origen orgánico, es decir de productores que eviten el uso de pesticidas y abonos químicos, esto para garantizar la pureza de los componentes.
3. Continuar el estudio de esta tintura, esta vez enfocado a la cuantificación de los componentes principales mediante estudios cromatográficos y la evaluación de la variación de la actividad inhibitoria mínima contra el tiempo, ya que en el presente estudio solo se llevó a cabo una medición a los 180 días.
4. Verificar la temperatura y la humedad de las cámaras de estabilidad para evitar errores debido a este problema.

10. REFERENCIAS.

1. Lozoya Xavier *et al.* Intestinal antispasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acuter diarrheica disease. J. of Etnopharmacol 2002; 83: 19-24
2. Olajide OA. *et al.* Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. Etnopharmacol. 1999; 63:175-178.
3. Germosen Robineau L. Farmacopea Vegetal Caribeña. Fort de France. Ed Emile Désormeaux. 1997. Pp. 360.
4. Aguilar JL. Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. Guatemala, Tipografía Nacional. 1996. pp. 383.
5. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala. Editorial Universitaria. 1996. Pp. 125
6. Cáceres A. *et al.* Control Microbiológico Sanitario. Guatemala. Cemat/Farmaya. 1996. S/p.
7. Gini G., Bran M. C. Manual de Practicas de Microbiología General. Guatemala. USAC. 1996. Pp. 27-29
8. Samayoa B. *et al.* Manual de Prácticas de Control De Calidad Microbiológico de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos. Guatemala. USAC. Pp. 35-39
9. House PR. *et al.* Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Tegucigalpa. UNAH-CEIMN-CEID/CIIR-GTZ. 1995. pp 555.

10. Gupta M. Plantas medicinales Iberoamericanas. CYTED-CAB. Bogota. 1995. Pp. 617.
11. Binutu OA. Lajubutu BA. Antimicrobial potencial of some plant species of the Bignoniaceae family. . Afr. J. Med. Sci. 1994; 23: 269-273.
12. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacterias of 16 plants. J. Ethnopharmacol. 1993; 38: 31-38.
13. Medinilla B. Evaluación farmacológica y toxicológica in vitro de algunas plantas comúnmente empleadas en Guatemala contra la malaria. Revista científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1993; 9:7-10
14. Lutterodt GD. Inhibition of Microlax-induced experimental diarrhoea with narcotic like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. J. Ethnopharmacol. 1992; 37: 151-157.
15. Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. México. Ed. Botas.1992. Pp. 656.
16. Soler B *et al.* Normas Ramales. Medicamentos de Origen Vegetal. Tinturas y Extractos fluidos. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba. 1992. S/p
17. Girón LM *et al.* Ethnobotanical Survey of the medicinal flora used by the caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol. 1991; 34: 173-187.
18. Glasby JS. Dictionary of plant cointaning secondary metabolites. London. Taylor y Francis. 1991. pp. 488

19. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* 1990; 30: 55-73.
20. López FJ. *et al* ***Tagetes lucida*** Cav. I. Inhibitory effect on smooth muscle contractility. *Phyton.* 1990; 51: 71-76.
21. Acevedo J. Uso de las plantas medicinales en problemas de aparato digestivo. Memorias V Seminario Nacional de Plantas Medicinales Guatemala, 1990. pp.109-116
22. Cortéz AR *et al.* ***Tagetes lucida*** Cav: II Anticholinergic effect on skeletal muscle and Heart of rat. *Phyton.* 1990. 51: 77-82
23. Cabrera BP. Validación científica de la actividad antiespasmódica *in vitro* de ***Cecropia obtusifolia*** Bertolin (guarumo) ***Chenopodium ambrosioides*** (apazote) ***Hyptis pectinata*** (alhucema) ***Jacaranda mimosifolia*** (jacaranda) y ***Yucca elephantipes*** (izote). (Tesis) Guatemala. Fac. CCQQ y Farmacia. USAC. 1990. pp. 33
24. Valle AL. Inhibición de la infección por ***Shigella dysenteriae*** en cornea de cobayo por extractos de hojas de ***Psidium guajava***, ***Spondias purpurea*** y ***Tagetes lucida***. (Tesis) .Guatemala. Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC. 1989 Pp. 21
25. Ortiz SD. . Elucidación del principio activo antiespasmódico en el extracto n-hexano del pericón. (***Tagetes lucida***). Guatemala. Rev. Cient. Fac. CCQQ. Y Farmacia. USAC. 1989; 7: 99-111
26. Ronquillo FA *et al.* Especies vegetales de uso actual y potencial de las zonas semiáridas del nororiente de Guatemala. Guatemala. Cuadernos DIGI. 1988; 5: 88. Pp. 249.

27. Shephard S *et al.* Persistent carriers of *Entamoeba histolytica*. Lancet. 1988. Pp. 501.
28. Zolla C. *et al.* Medicina tradicional y enfermedad. México, CEISS, 1988. Pp146.
29. Orellana SL. Indian Medicine in Highlands Guatemala. Albuquerque, University of New Mexico press. 1987 Pp. 309
30. Morton JF. Fruits of Warm Climates. Greensboro, Media Inc. 1987. Pp. 505.
31. Nelson CL. Plantas Comunes de Honduras. Ed. Universitaria. Tegucigalpa. 1986. Pp. 922.
32. Hethelyi E *et al.* GC/MS Analysis of essential oils of some *Tagetes* species. In: Brunke EJ Progress in essential oil research. Berlín, Walter D Gruyter 1986. Pp 131-137.
33. Oliver Bever B. Medicinal Plants in Tropical West Africa. Cambridge, Unif. Press, 1986 Pp. 134.
34. Berdy J *et al.* Handbook of Antibiotic Compounds. Vol. VIII. Part. Boca Ratón, CRC Press. 1982. Pp. 1410, 2429.
35. Marroquín E. Contribución al estudio farmacológico de *Tagetes lucida* (Pericón) como antiespasmódico. (Tesis). Guatemala. Fac. de CCQQ y Farmacia. USAC. 1981.
36. Siegel RK *et al.* On the use of *Tagetes lucida* and *Nicotiana rustica* as a Huichol smoking mixture: the Aztec “yahutli” with suggestive alucinogenic effects. Econ. Bot. 1977; 31:16-23.

37. Rodríguez E, Mabry TJ. Tagetes Chemical Review. Biol. Chem. Compos. 1975; II: 785.
38. Logan MH. Digestive disorders and plant medicinals in highlands Guatemala. Anthopos . 1973; 68: 537-547.
39. Mitscher LA *et al.* Antimicrobial agents from Higher plants. I. LLOYDIA. 1972; 35:157-156.
40. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Charles C. Thomas, Springfield, 1972. Pp. 1420.
41. Diurez R *et al.* Glaucarrubin in the treatment of amebiasis. Presse Med. 1962; 20: 1291.
42. Comisión Guatemalteca de Normas. Norma obligatoria guatemalteca para Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano. COGUANOR 11.01.04:04. 2004. Pp. 2-16
43. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials - World Health Organization. WHO/PHARM/92.559.

11. ANEXOS

11.1 INFORMACION DE LOS COMPONENTES

Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia* D. Don.)

Descripción botánica:

Árbol con corteza pálida, copa ancha, ramas glabras, hasta 15 m. de alto con tronco de 30 cm de diámetro. Hojas grandes, compuestas de 20-40 ejes laterales, 19-45 foliolos, oblongo u oblongolanceolados, 6-8 mm de largo, ápice agudo, base desigual; panículas largas, cerradas, elásticas. Flores blanquecinas, cáliz 3-4 mm de ancho, acortadas y mucronuladas, sésiles, pueden ser glabras. Panículas largas, abundantes flores, 15-25 cm de longitud; cáliz de 2 mm de longitud, campanulado, denticulado, corola azul, 3-5 cm de largo, tomentosa. Fruto en cápsula redonda, duro, suborbicular, glabro, 6 cm de largo, truncado o apiculado en el ápice, abundantes semillas aladas de 1.5-2.5 cm. Nativo de Sur América desde Colombia hasta Argentina, cultivado en regiones tropicales y subtropicales. En Guatemala se ha descrito en la mayoría de los Departamentos.

Descripción y propiedades medicinales:

Árbol de la familia Bignoniácea originario de Sur América, ampliamente cultivado como planta ornamental por sus flores de color morado-azulosas. La infusión y la tintura de flores, hojas y corteza son usadas en Guatemala para el tratamiento de amebiasis y otras afecciones gastrointestinales agudas. Se le atribuye propiedad antiséptica, antiamebiana, antitumoral y espasmolítica.

Información farmacológica y toxicológica:

La tintura de flores es activa contra bacterias Gram negativo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*) y contra *Candida albicans*. La infusión de flores tiene actividad espasmolítica in vitro sobre receptores muscarínicos y musculotrópicos del intestino aislado de rata cuando se emplea clorhidrato de acetilcolina como agente espasmogénico y el extracto etanólico de las flores es relajante del músculo liso. No se reporta información sobre su toxicidad.

Composición química:

Los componentes polares de las hojas contienen ciclohexanona (jacarandosa), un glucósido fenilpropanoide, un vebascósido (acetósido), un nuevo éster de glucosa (jacaranosa) y flavonoides (scutellareina-7-glucorónido), mientras que la ausencia de iridioides fue total. Las flores contienen flavonoides (apigenina-7-o-neohesperidósido, agipenina 8-o-β-D-glucósido, cianidin-3-o-β-D-rutinósido, delfina, 3,5-di-o-β -D-glucosi delfidina). En otras especies del genero Jacaranda que se usan medicinalmente se ha demostrado que contienen un alcaloide cristalizado (carobina) y una resina (carbona), ácido gálico y aceite esencial.

GUAYABA (*Psidium guajava* L.)

Descripción y propiedades medicinales:

Árbol de la familia Mirtaceae autóctono del sur de México y Centro América, su distribución geográfica es amplia en el continente y su producción es por recolección y cultivo en zonas cálidas y templadas, principalmente por su fruto, del cual se han desarrollado más de 60 variedades comerciales. Su principal uso medicinal es para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, respiratorias y dermatomucosas (40-17). Se le atribuye propiedad antidiarreica, antiespasmódica, astringente, digestiva, emenagoga, hemostática, sedante, vermífuga y vulneraria. (2, 21, 3, 29)

Información farmacológica y toxicológica:

Por su alto contenido de taninos y su actividad astringente, es efectiva en el tratamiento de diarrea y espasmo abdominal. (3, 21). La tintura ha demostrado actividad contra bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*) (11, 14). En un modelo en ratón se demostró que disminuye significativamente el tránsito intestinal con una relación dosis-efecto (3); los glucósidos de quercetina tienen actividad espasmolítica e inhibitoria de la peristálsis (1) y presenta una clara reducción en la amplitud de la respuesta muscular al profundirse intraluminalmente en ilion de cobayo en relación dosis respuesta (1), actividad que se ha confirmado en otros modelos de hiperpropulsión del tránsito en el intestino delgado de

ratas, actuando por un mecanismo de inhibición del aumento de las secreciones acuosas (12). El extracto metanólico inhibe el edema podal inducido por carragenina en la rata (1). Estudios clínicos para comparara la actividad antidiarreica con caolín y pectina demuestran que los tratamientos son similares (28). La actividad antibacteriana se atribuye a la guayaberina (avicularina), flavonas y ácido guayabólico; la actividad antiprotozoárica al ácido psidiólico (28, 34). La actividad antidiarreica se atribuye a la guayaberina y otras quercetinas, que ha demostrado una definitiva acción antisecretoria en la liberación de acetil colina (Ac), efecto que no es reversible por la Naloxona. Este efecto se debe al bloqueo de los canales de calcio o la inhibición del sistema enzimático responsable de la síntesis de prostaglandinas que a su vez se relaciona con la liberación de acetil colina; el extracto etanólico muestra una inhibición de la liberación de acetil colina similar a la producida por morfina (12).

La infusión de hojas ensayadas separadamente en ratones por vía oral en dosis de 1 a 5 g/kg no produce toxicidad aguda (2). El extracto metanólico (5mg /placa) tiene actividad antimutagénica contra la toxicidad inducida por radiación ultravioleta y diversos mutágenos (3).

Composición química:

Toda la planta es rica en taninos (hojas 9-12%; corteza 26-32%) (33). Las hojas contienen Beta sitosterol y ácido maslínico. El aceite esencial contiene hidrocarburos sesquiterpénicos (aromandreno, betabisaboleno, cariofileno, sineol, nerelidol, beta selineno y sel-11-en-4- α -ol), triterpenoides (ácidos oleanólicos, ursólico, categórico y guayabólico), flavonoides (derivados de quercetina, guayaverina, glicósido de 3- α -L-arabopiranosido y quercetin-3-arabinósido), glicósido del ácido elágico, leucocianidina y derivados del ácido gálico (3, 4, 29).

Pericón (*Tagetes lucida* Cav.)

Descripción y propiedades medicinales:

Planta de la familia asteraceae nativa de Mesoamérica. Tiene una amplia distribución y uso medicinal, saborizante culinario y religioso en toda la región. Su producción es por recolección en el altiplano (2). Su uso medicinal está muy difundido en toda la población, principalmente la infusión de hojas y flores para el tratamiento de diarrea y dolor de estómago (6, 12, 30, 33, 38, 40). Se le atribuye propiedad antiespasmódica, antiséptica, antibacteriana, antidiarreica, carminativa, antiinflamatoria, digestiva y febrífuga (2, 21, 36).

Información farmacológica y toxicológica:

La infusión y tintura de hojas y flores tiene actividad contra las bacterias causales de diarrea (14). En un modelo In vivo se demostró que la pomada a base de la tintura, inhibe el crecimiento de *Shigella dysenteriae* en la cornea del cobayo y disminuye los días en que cura la queratoconjuntivitis experimental (23). La actividad antibiótica se atribuye al α -tertienilo que se ha descrito en varias especies de *Tagetes* y a la herniarina (34). El extracto acuoso tiene actividad Espasmolítica evaluada en un modelo in vitro usando duodeno de rata aislado (35), con DE₅₀ en ratón de 500 mg/mL in vitro y 20 g/Kg in vivo; la estructura química responsable es la herniarina (25). Resultados similares se obtuvieron en músculo liso de yeyuno de conejo (19) y actividad anticolinérgica en músculo esquelético y cardíaco de rata (15). Los taninos y pectina son responsables de la actividad antidiarreica (29).

Composición química:

Las hojas y flores contienen aceite esencial (limoneno, β -ocimeno, β -cariofileno, mirceno, anetol, anisol, esdragol, éter metílico de eugenol, tagetona, dihidro tagetona, linalool (32), alcaloides cuaternarios, cumarinas (dimetilalileter de 7-hidroxycumarina, 7-metoxicumarina y 6, 7, 8-trimetoxicumarina), flavonoides (quercetagetina, patuletina), derivados de tiofeno, β -tertienilo, saponinas, leucoantocianinas, leucinas, taninos, goma y sales minerales (15, 18, 37)

Aceituno o Jocote de Mico: (*Simarouba glauca* DC.)

Descripción y propiedades medicinales:

Árbol de la familia Simaroubaceae nativo de norte y centroamérica. La infusión de la corteza se usa para el tratamiento de malaria, parásitos intestinales y amebiasis (15, 31, 37); la tintura de la corteza y semillas se usa en el tratamiento de amebiasis y diarrea persistente (12). A la corteza y hojas se les atribuye propiedad antiamebiana, astringente, estomáquica, febrífuga y tónica (2).

Información farmacológica y toxicológica:

La tintura de hojas es activa contra *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* (14). Las hojas y corteza son activas contra protozoarios, particularmente *Entoameba histolytica*, *Plasmodium gallinaceum* (21) y esquizontes de *Plasmodium bergheii* (11). El principio activo es la glaucarrubina, un éster del glaucarrubol, un antiamebiano con actividad contra las formas vegetativas y quísticas de *Entoameba histolytica* y relativamente bien tolerados (41), glaucarrubinona es activa contra *Plasmodium falciparum* a dosis de 0.006 mg/mL (3, 28).

En un ensayo clínico realizado en 30 pacientes con amebiasis, Vindas en Costa Rica, demostró en 1951 que la tintura de la corteza al 20% administrado 10-60 gotas tres veces al día después de las comidas es activa contra infecciones por *Entoameba histolytica* (15); en otro ensayo clínico por administración rectal del extracto acuoso en 7 pacientes se demostró curación en tres días (27). La DL₅₀ de la glaucarrubina por vía oral en ratas es de 800 mg/kg y por vía subcutánea 28 mg/kg (34).

Composición química:

Las hojas y corteza contienen flavonoides, polifenoles, sesquiterpenlactonas, taninos (27), alcaloides y cuasinoides (15-O-β-D-glucopiranosilglaucarrubol, 15-O-β-D-glucopiranosilglaucorrubolona) (32).

11.2 CONDICIONES PARA REALIZAR ESTUDIOS DE ESTABILIDAD:

La estabilidad de un medicamento debe realizarse en condiciones ya sea acelerada o normal.

Condiciones para realizar Estudios de Estabilidad Acelerada:

Se aplica para el registro de un medicamento o modificaciones a las condiciones de registro, se deben llevar a cabo en tres lotes piloto o tres lotes de producción con la formulación y el material de empaque o envase primario, sometido a registro.

Condiciones del estudio de estabilidad	
Sustancias que no requieran refrigeración ni congelación.	
Tiempo 3 meses (90 días)	
Condiciones de Almacenamiento	Análisis
40 °C ± 2°C con 75% ± 5% de humedad relativa para formas farmacéuticas sólidas	Inicial 30 días 60 días 90 días
40 °C ± 2°C para formas farmacéuticas líquidas y semisólidas.	Inicial 30 días 60 días 90 días
40 °C ± 2°C para todas las demás formas farmacéuticas	Inicial 30 días 60 días 90 días

Nota: Se acepta para objeto del reglamento técnico, como mínimo tres intervalos analíticos, el inicial, el final y uno intermedio de los cuales, este último puede ser un

tiempo menor o mayor de 60 días. Se aceptan también 4 o mas intervalos para apoyar el estudio.

Condiciones de estudio para medicamentos que requieren refrigeración	
Condiciones de almacenamiento	Análisis
25 °C ± 2°C con 60% ± 5% de humedad relativa	Tiempo no menor a 6 meses.

El empaque primario de un medicamento con un principio activo fotosensible debe proporcionar protección a la luz y demostrar que el producto es estable. Para esto debe evaluar un lote conservado bajo condiciones de luz natural o luz artificial que simule las condiciones normales, durante un período de 3 meses con análisis inicial y final. En el caso que el producto lleve un empaque que lo proteja de la luz, se requerirá únicamente la presentación de documentación técnica que avale dicha protección.

Si el medicamento en estudio no cumple con los requisitos de tiempo, humedad o temperatura descritas en las secciones anteriores, se deben realizar estudios de estabilidad a largo plazo bajo condiciones particulares y el tiempo en que se propone conservar el producto, presentando resultados a tiempo inicial y a tiempo de 12 meses.

Condiciones para realizar estudios de estabilidad a largo plazo.

Se efectúan en tres lotes piloto o entres lotes de producción en condiciones naturales o normales controladas de almacenamiento por un período mínimo, igual al período de caducidad tentativo. Para confirmar el período de caducidad de un medicamento deberá analizarse de acuerdo al siguiente intervalo:

Período	Frecuencia de análisis
Primer año	Inicial, 3, 6, 9, 12 meses
Segundo año	18 y 24 meses
Tercer año	Cada 12 meses hasta un máximo de 5 años

Nota: se aceptarán otras frecuencias de análisis siempre y cuando se demuestre el período de validez propuesto para el producto.

Condiciones de estudio para medicamentos que requieren refrigeración.	
Condiciones de almacenamiento	Análisis
5°C ± 3°C	Tiempo no menor de 12 meses.

Condiciones de estudio para medicamentos que requieren congelación.	
Condiciones de almacenamiento	Análisis
-20°C ± 5°C	Tiempo no menor de 12 meses.

Se puede aplicar los estudios reducidos empleando métodos estadísticos como Matrixing y Bracketing.

Cambios posteriores:

Toda solicitud de cambio posterior al registro requiere la presentación de estudios de estabilidad, cuando se haya modificado uno o más de los siguientes puntos:

- El material de empaque o envase primario.
- La fórmula en términos cualitativos y cuantitativos. No será necesario presentar estudios de estabilidad del producto con una nueva fórmula cualicuantitativa en el caso de modificaciones en las cantidades de excipientes de un máximo de 10% con respecto al peso total de la fórmula (en el caso de líquidos puede ser con respecto al peso como al volumen), siempre y cuando no se le agreguen nuevos excipientes al producto ni se suprima alguno que sea fundamentalmente necesario para su estabilidad (estabilizantes, preservantes, etc.) Además, de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura, será responsabilidad del titular del medicamento, el llevar a cabo estudios que demuestren que la estabilidad del producto no se ha alterado al cambiar un proveedor de materia prima o alguna característica física de la presentación de la materia prima.
- El método de fabricación del producto.

- El sitio de manufactura: En el caso de un cambio en el sitio de manufactura hacia una localización distante de la original (por ejemplo: un cambio de país o de provincia), deben realizarse nuevos estudios de estabilidad de un mínimo de dos lotes. Esto con el fin de establecer si es válido aplicar al producto fabricado en el nuevo sitio, el mismo período de vencimiento asignado originalmente, siempre y cuando los resultados sean satisfactorios. Pueden admitirse datos de estudios acelerados de estabilidad de mínimo tres meses, realizados con muestras del nuevo sitio de fabricación y con un compromiso de realizar el estudio de estabilidad bajo condiciones naturales de almacenamiento, por parte del titular y presentarlo ante la autoridad de salud competente. Dicho de otra manera, es necesario demostrar en un estudio acelerado que a los tres meses se obtienen, con el producto fabricado en el nuevo sitio, resultados comparables a los que se obtuvieron, en su momento, con el producto fabricado en el sitio original siguiendo el mismo protocolo, para que de esta forma se pueda asignar la misma fecha de vencimiento que había sido aprobada inicialmente, la cual quedará sujeta a comprobación con estudios bajo condiciones naturales de almacenamiento. Si el cambio de sitio de manufactura se da en la misma planta o en la misma área climática dentro del mismo país, no será necesario presentar resultados de nuevos estudios de estabilidad, siempre y cuando se mantengan condiciones similares en cuanto a la fórmula, el método de manufactura y los equipos empleados.
- Todos aquellos otros factores que puedan afectar la estabilidad del producto a criterio del titular.

Evaluaciones del criterio de estabilidad de un medicamento.

El estudio de estabilidad de un medicamento, debe incluir las pruebas requeridas para cada forma farmacéutica. Cuando el medicamento no requiere alguna de las pruebas indicadas, deberá sustentarse técnicamente.

La determinación de las sustancias relacionadas y/o productos de degradación, se realizará cuando la monografía lo establezca.

Parámetros a evaluar:

Tabletas, tabletas recubiertas y grageas:

Concentración de principio activo, características organolépticas, desintegración, disolución y humedad cuando proceda.

Cápsulas:

Concentración de principio activo, características organolépticas del contenido y de la cápsula, disolución y humedad cuando proceda.

Emulsiones:

Concentración de principio activo, características organolépticas, viscosidad y límites microbianos. Cuando proceda prueba de eficacia de conservadores y valoración de los mismos y esterilidad. Todos los estudios deben llevarse a cabo en muestras en contacto con la tapa para determinar si existe alguna interacción entre ellos, que afecte la estabilidad del producto.

Soluciones y suspensiones:

Concentración de principio activo, características organolépticas, pH, límites microbianos y cuando proceda: suspendibilidad (en suspensiones), pérdida de peso (envase de plástico), prueba de eficacia de conservadores y valoración de los mismos, esterilidad, materia particulada. Todos los estudios deben de llevarse a cabo en muestras en contacto con la tapa para determinar si existe alguna interacción que afecte la estabilidad del producto.

Polvos para suspensión para uso oral:

Concentración del principio activo, características organolépticas, humedad y cuando proceda prueba de eficacia de conservadores y valoración de los mismos, límite microbiano, éste se debe llevar a cabo en análisis inicial y final. Al reconstituirlo, se deben seguir las instrucciones indicadas en la etiqueta y los

parámetros a examinar durante el período de conservación recomendado son: concentración del principio activo, características organolépticas y pH.

Soluciones inyectables, polvos para suspensión inyectable y polvos liofilizados:

Concentración del principio activo, características organolépticas, humedad y cuando proceda prueba de eficacia de conservadores y valoración de los mismos, esterilidad, pirógenos, 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 período de conservación recomendado son: concentración de principio activo, características organolépticas y pH.

Aerosoles y nebulizadores:

Concentración de principio activo, dosis de aspersion concentración/acción de la válvula cuando aplique, características organolépticas, tamaño de la partícula en suspensiones. Se debe considerar las especificaciones para límite microbiano.

Cremas, geles, pastas y ungüentos (pomadas):

Concentración de principio activo, características organolépticas, homogeneidad, viscosidad, pH, límites microbianos. Cuando proceda: Prueba de eficacia de conservadores y valoración de los mismos, tamaño de la partícula, pérdida de peso (envase plástico) y esterilidad.

Supositorios y óvulos:

Concentración de principio activo, temperatura de fusión, características organolépticas, disolución cuando aplique y tiempo de licuefacción.

Si existen otros parámetros físicos, químicos o biológicos del medicamento que nos mencionen que puedan afectar el estudio de estabilidad, se deben determinar de acuerdo a lo establecido en la bibliografía internacional reconocida.

Para las formas farmacéuticas no incluidas, las pruebas físicas, químicas, microbiológicas y biológicas que deben efectuar durante un estudio de estabilidad deben ser las reportadas en la bibliografía internacional reconocida o del fabricante, debidamente validadas.

Para obtener un período de vencimiento tentativo, se requiere que los datos analíticos de los estudios acelerados de estabilidad demuestren que los resultados no se salgan de las especificaciones. Se considera que un medicamento sometido a este tipo de estudio ha sufrido cambios significativos cuando.

- El porcentaje de pérdida de potencia inicial está por debajo del límite inferior especificado en la monografía del producto.
- Los productos de degradación o sustancias relacionadas exceden el criterio oficial de aceptación u otro establecido por el fabricante, si no existiera un criterio oficial.
- El pH del producto excede las especificaciones aceptadas por el fabricante, en los casos en que sea aplicable.
- La disolución excede el criterio de aceptación oficial hasta por un máximo de 24 unidades ensayadas en los casos que sea aplicable.
- El producto no reúne los criterios de aceptación para las características físicas, de apariencia o ambas de acuerdo con las especificaciones del fabricante y según la forma farmacéutica (por ejemplo color, olor, sabor, homogeneidad, dureza, friabilidad, viscosidad, facilidad de resuspensión, etc.)
- Se excede el límite microbiano según el caso.

- Estos datos anteriormente expresados deben ser confirmados con estudios de estabilidad a largo plazo o de estantería.

El período de validez será asignado por el fabricante y autorizado por la autoridad competente.

El período de validez asignado por el fabricante, puede ser ampliado cuando se justifique con la presentación del estudio de estabilidad a largo plazo o de estantería de tres lotes de producción, por medio de un dictamen. Sin embargo, no puede ser mayor a 5 años.

Para los productos biológicos, además de los parámetros descritos, según su forma farmacéutica, se requiere evaluar su potencia como actividad biológica, de acuerdo a lo que establecen las Farmacopeas y la bibliografía reconocida o la propia investigación del fabricante.

Para un medicamento con la misma forma cualitativa en el mismo material de envase, en presentaciones con diferente concentración de principio activo, pueden presentarse los resultados del estudio de estabilidad de las presentaciones con menor y mayor concentración del principio activo.

Información a incluir en el formato para presentar resultados de estudios de estabilidad.

Los resultados de los estudios de estabilidad deben estar firmados y sellados por el profesional responsable del estudio. Se pueden admitir también estudios de estabilidad de un laboratorio de referencia, firmados por el director técnico de dicho laboratorio.

Para medicamentos importados, la documentación debe ser firmada y sellada por el profesional responsable del estudio.

Un estudio de estabilidad debe contar con la siguiente información:

Información general:

- Nombre comercial y genérico del producto.
- Forma farmacéutica y concentración del principio activo.
- Nombre del fabricante y país de origen.
- Fecha de realización del estudio (inicio y final del estudio)

Información relativa de lotes evaluados:

- Fórmula cuali-cuantitativa del producto.
- Código de lote (mínimo tres lotes)
- Fecha de fabricación.
- Tamaño del lote.

Descripción del material de envase y empaque.

- Empaque primario
- Sistema de cierre

Especificaciones del producto.

- Los valores de temperatura y humedad relativa correspondiente a cada grupo de datos.
- Los datos de potencia obtenidos correspondiente a cada lote, expresados en términos de valor absoluto y promedio, \pm desviación estándar.
- Los resultados del ensayo de disolución (cuando aplique), los cuales deben expresarse en porcentaje sobre lo etiquetado en forma individual para cada unidad evaluada y como promedio del número de unidades según etapa del ensayo.
- Si las concentraciones no son cuantificables, los resultados deben ser referidos a los límites de sensibilidad del método, expresados en función de la concentración estándar. Cuantificación de los productos de degradación, cuando existan especificaciones de los límites.

- Los resultados de los estudios de desafío a los preservantes con el fin de demostrar que su actividad mantiene al final de la vida útil de aquellos medicamentos en los cuales la concentración de preservantes es un parámetro crítico. (por ejemplo, colirios, inyectables de dosis múltiple, etc.)
- Los demás parámetros indicativos de la estabilidad física, química o microbiológica del producto (según sea la forma farmacéutica), relevantes a la estabilidad.
- Se debe incluir la discusión y conclusiones del estudio indicando el período de validez solicitado y las condiciones de almacenamiento definidas para el producto. Podrán aceptarse condiciones de almacenamiento, en el etiquetado, indicando una temperatura máxima que sea no menor de 5°C por debajo de 30°C (Zona IV) o de la temperatura aprobada para el estudio.
- El nombre, la firma y el sello del profesional responsable del estudio de estabilidad así como el nombre del laboratorio y país donde se llevo a cabo dicho estudio. Debe indicarse los criterios de aceptación, conformidad con los mismos y disposición final.

Metodología analítica para cada parámetro evaluado.

- Cuando se cambie el método analítico durante el estudio de estabilidad, debe mostrarse que los dos métodos son equivalentes mediante un proceso de validación.

Método analítico validado.

Tablas de resultados con sus fechas de análisis.

Que la autoridad competente podrá solicitar la presentación de los tratamientos matemáticos y estadísticos a los cuales fueron sometidos los datos para el establecimiento del período de validez propuesto por el fabricante, en aquellos casos en los que existan dudas.

Ensayo de estabilidad:

- Condiciones de almacenamiento.
- Intervalos analíticos.
- Fecha de muestreo.
- Para medicamentos que deben ser reconstituidos presentar datos de estabilidad de la formulación tanto antes como después de la reconstitución.
- Evaluación y análisis de datos.
- Conclusiones. Propuesta de fecha de vencimiento y condiciones de almacenamiento.

11.3 LIMITES DE CONTAMINACION MICROBIANA EN MATERIALES DE PLANTAS MEDICINALES

A. Material crudo de plantas para ser procesado posteriormente (incluyendo procedimiento de descontaminación físico o químico). Los límites son determinados para material de plantas cosechadas bajo condiciones higiénicas aceptables y que no ha recibido tratamiento.

Por g máximo 10^4 *Escherichia coli*

B. Material de plantas que serán pretratadas (por ej: **Té de hierbas e infusiones**) o si el material será usado tópicamente.

Por g **máximo 10^7 bacterias aeróbicas**
 Máximo 10^3 mohos y levaduras
 Máximo 10^2 *Escherichia coli*
 Máximo 10^4 otras enterobacterias
 (No *Salmonella spp.*)

C. Otros materiales de plantas para uso interno (**tinturas y elixires**).

Por g - mL **máximo 10^5 bacterias aeróbicas**
 máximo 10^3 mohos y levaduras
 máximo 10^1 *Escherichia coli*
 máximo 10^3 otras enterobacterias
 (no *Salmonella spp.*)(15)

Límite de Contaminación Microbiana aceptado para Material Fitofarmacéutico según norma.

100 NMP/g-mL.....aceptable
 100-460 NMP/g-mL.....regularmente aceptable
 Mayor de 460 NMP/g-mL.....inaceptable o rechazado

CATEGORIAS DE DROGAS CRUDAS VEGETALES SEGUN TENOR MICROBIANO DE ACUERDO A LOS CRITERIOS DE LA OMS (15)

CATEGORIA	COLIFORMES TOTALES	COLIFORMES FECALES	E.COLI	USO
A	+ Max 100 NPM/g 1000 UFC/g	+ Max 10 NMP/g 10 UFC/g	Negativo	Polvos (Cápsulas).
B	+ Max 460 NMP/g 10000 UFC/g	+ Max 10 NMP/g 100 UFC/g	Negativo	Infusiones
C	+ Max 460 NMP/g 10000 UFC/g	+ Max 10 NMP/g 10000 UFC/g	Negativo	Tinturas y elíxires.

10.4 CAMBIOS REALIZADOS A LA NORMATIVA DE ESTABILIDAD EN EL AÑO 2006.

Condiciones para realizar estudios de estabilidad

La estabilidad de un medicamento debe realizarse en condiciones aceleradas o normales.

Condiciones para realizar estudios acelerados de estabilidad.

Se aplica para el registro de un medicamento o modificaciones a las condiciones de registro; se deben llevar a cabo en tres lotes piloto o tres lotes de producción con la formulación y el material de empaque / envase primario sometido a registro.

Condiciones del estudio de estabilidad sustancias que no requieran refrigeración ni congelación.	
Tiempo 6 meses (180 días)	
Condiciones de Almacenamiento	Análisis
40 °C ± 2°C con 75% ± 5% de humedad relativa para formas farmacéuticas sólidas	Inicial 90 días 180 días
40 °C ± 2°C para formas farmacéuticas líquidas y semisólidas.	Inicial 90 días 180 días
40 °C ± 2°C para todas las demás formas farmacéuticas	Inicial 90 días 180 días

Nota: Se acepta para objeto de este Reglamento Técnico, como mínimo tres (3) intervalos analíticos, el inicial, el final y uno intermedio de los cuales este último, puede presentarse a un tiempo menor o mayor de 90 días. Se aceptan, también, cuatro ó más intervalos para apoyar el estudio.

Condiciones de estudio para medicamentos que requieren congelación.	

Condiciones de almacenamiento	Análisis
-20°C ± 5°C	Tiempo no menor de 6 meses.

El empaque primario de un medicamento con un principio activo fotosensible debe proporcionar: protección a la luz y demostrar que el producto es estable. Para esto debe evaluar un lote conservado bajo condiciones de luz natural o luz artificial que simulen condiciones normales, durante un tiempo de 3 meses con análisis inicial y final. En el caso que el producto lleve un empaque que lo proteja de la luz, se requerirá únicamente la presentación de documentación técnica que avale dicha protección.

Si el medicamento en estudio no cumple con los requisitos de tiempo, humedad o temperatura descritas en los párrafos anteriores, deben realizar estudios de estabilidad a largo plazo bajo condiciones particulares y el tiempo en que se propone conservar y/o usar el producto, presentando resultados a tiempo inicial y tiempo 12 meses.