

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION DE
TRES CONTAMINANTES NATURALES EN LOTES DE
PEROXISOMICINA A₁

Por

Q.C.B. Gloria María Molina Salinas

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica Biomédica

Febrero, 1998

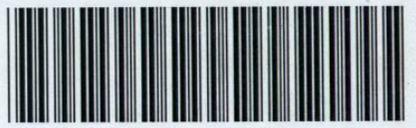
TM

QP981

.K37

M6

c.1



1080080875

17766

DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION DE TRES CONTAMINANTES

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

MT
T.G.FINR
DM

Aprobación de la Tesis:

[Signature]
Dr. med. ALBERTO OPEZ



[Signature]
M.C. LIDIA ...

[Signature]
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION DE TRES CONTAMINANTES NATURALES EN LOTES DE PEROXISOMICINA A₁

DR. MA. DELA LUZ SALAZAR CAVAZOS

2do. Vocal

Por

Q.C.B. Gloria María Molina Salinas

3er. Vocal

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica Biomédica



Febrero, 1998

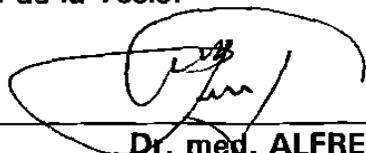
TM
RM172.7
M6



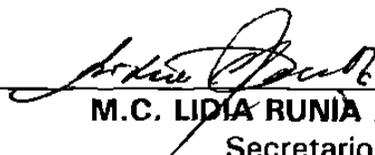
(80875)

**DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION DE TRES CONTAMINANTES
NATURALES EN LOTES DE PEROXISOMICINA A₁**

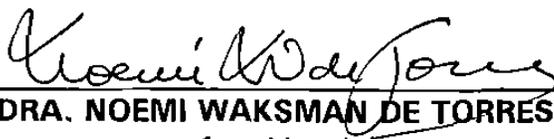
Aprobación de la Tesis:



Dr. med. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ
Presidente



M.C. LIDIA RUNIA NACCHA
Secretario



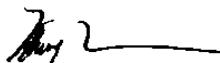
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
1er. Vocal



M.C. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
2do. Vocal



M.A. ANGEL ENRIQUE ALCORTA GARZA
3er. Vocal



Dr. med. MA. ESTHELA MORALES PEREZ
Secretario Académico del Area Básica
Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A Dios por permitirme existir.

A mi padre como un pequeño tributo a su vida llena de humildad, sacrificio y amor. A mi madre con la cual comparte estas virtudes. Ellos han sido la fuente de aliento para mí.

A mis hermanos: Elio Jr., Mirna Elizabeth, Cynthia Laura y José Juan, por su cariño incondicional.

**A mi sobrina Monique Aleth
por ser una gran fuente de alegría.**

A mi abuela Angélica García Vda. de Salinas, ejemplo de perseverancia, ayuda al prójimo y amor.

**A mis familiares, amigos y
compañeros por apoyarme siempre.**

EN MEMORIA

**De mis abuelos Raúl Molina Pompa, Mannela Salinas Vela de Molina
y Juan José Salinas Salinas, este último víctima del cáncer,**

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Alfredo Piñeyro López y Noemí Waksman de Torres por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto de investigación.

A la Dra. Noemí Waksman de Torres, por sus asesoría, consejos y sugerencias para incrementar la calidad de este trabajo; por el tiempo dedicado a la solución de los problemas que se presentaron durante el desarrollo de esta tesis.

A los miembros de la Comisión de Tesis: Dr. med. Alfredo Piñeyro López, M.C. Ma. de la Luz Salazar Cavazos, M. A. Angel Enrique Alcorta Garza y M.C. Lidia Runnia Naccha Torres por su ayuda, estímulos y valiosos consejos recibidos durante este trabajo, así como por la revisión final de este escrito.

A mis maestros de Pre y Posgrado, por sus enseñanzas.

A los Dres. Victoria Bermúdez de Rocha, Herminia Martínez Rodríguez, Myrthala Moreno, Linda E. Muñoz, Jorge Valenzuela-Rendón, Carlos E. Medina y Francisco J. Martínez, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros del Posgrado, los cuales se han convertido en verdaderos amigos: Q.C.B. Paula Cordero, M.C. Angeles Castro, M.C. Magdalena Martínez, Q.C.B. Martha Salazar, Q.C.B. Rosario Torres, Dra. Irma Calderón, M.C. Marta Ortega, Dr. Marco Flores, D.C. Angel Licón, Q.C.B. Víctor Torres, M.C. Ricardo Salazar y M. C. Adolfo Caballero.

A mis ex-compañeros y amigos del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario y Clínica de Servicios Médicos de la U.A.N.L. por su comprensión y estímulos al decidir ingresar a este campo: la investigación básica.

Al Dr. Roberto José Carrillo González, Director de la Facultad de Odontología por su confianza, al brindarme la oportunidad de colaborar como Maestra del Departamento de Bioquímica.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, Director de nuestra Facultad por el apoyo recibido para la asistencia a congresos, cursos y obtención del grado de Maestro en Ciencias.

A todas las personas que de alguna manera colaboraron en la culminación de este trabajo.

NOMENCLATURA

A	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Centígrado
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCF-FN	Cromatografía en Capa Fina Fase Normal
CCF-FR	Cromatografía en Capa Fina Fase Reversa
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLAR-FR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Fase Reversa
CLAR-FR-C8	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Fase Reversa, con columna C8
CLAR-FR-C18	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Fase Reversa, con columna C18
CLAR-Prep	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Preparativa
cm	centímetro
cols.	colaboradores
CT ₅₀	Concentración Tóxica Media
DES	Diferencia Estadísticamente Significativa
Dias	Diastereoisómero
EEP	Extracto de Eter de Petróleo
EM	Extracto Metanólico
EP	Eter de Petróleo
EtOH	Etanol
F	Fracción
FE	Fase Estacionaria

Fig	Figura
FM	Fase Móvil
g	gramo
HAc	Acido Acético
hr	hora
Iso	Isómero
Iso-PA ₁	Iso-Peroxisomcina A ₁
kg	kilogramo
λ	longitud de onda
L	Litro
M	Molar
MeOH	Metanol
μg	microgrmo
mg	miliagramo
min	minuto
μL	microlitro
mL	mililitro
μM	micromolar
mM	milimolar
nm	nanómetro
ODS	Octadecilsilano
PA ₁	Peroxisomicina A ₁
PA ₃	Peroxisomicina A ₃
pH	potencial de Hidrógeno
%p/p	por ciento peso/peso
ppm	partes por millón
Ppt	Precipitado, Precipitar
Rf	Factor de retardo
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
T	Toxina
t _R	tiempo de Retención
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
U/mL	Unidades por mililitro

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	página
1. INTRODUCCION	1
1.1 El cáncer y su tratamiento.	1
1.2 El papel de las plantas en el tratamiento del cáncer.	2
1.3 Los estudios fitoquímicos de las plantas del género <i>Karwinskia</i>	3
1.4 El Control de Calidad de un producto de interés farmacológico:	
la Peroxisomicina A ₁	5
1.5 Objetivos del Trabajo.	9
1.5.1 Objetivo General.	9
1.5.1 Objetivos Específicos.	9
 2. MATERIAL Y METODOS.	 10
2.1 Material Biológico.. . . .	10
2.2 Material y Equipo.	10
2.2.1 Material General.	10
2.2.2 Equipo.	10
2.3 Métodos.	12
2.3.1 Control de Calidad del Lote 75 de Peroxisomicina A ₁	12
2.3.2 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A ₃ , Iso-	
Peroxisomicina A ₁ y T516.	14
2.3.3 Evaluación de la Pureza Fisicoquímica de	
Peroxisomicina A ₃ , Iso-Peroxisomicina A ₁ y T516.	14
2.3.4 Contaminación de las muestras de Peroxisomicina A ₁	15
2.3.5 Análisis estadístico de las muestras de	
Peroxisomicina A ₁ contaminadas y sin contaminar.	17

Capítulo	página
3. RESULTADOS.	24
3.1 Control de Calidad del Lote 75 de Peroxisomicina A ₁ .	24
3.1.1 Punto de Fusión Inicial y Final..	24
3.1.2 Pureza Espectroscópica.	24
3.1.3 CCF-FN.	24
3.1.4 CCF-FR.	24
3.1.5 CLAR-FR.	24
3.1.6 Ensayo de la Inhibición de Catalasa.	24
3.2 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A ₃ , Iso-Peroxisomicina A ₁ y T516.	24
3.2.1 Elección del fruto de <i>K. parvifolia</i> con mayor concentración de Peroxisomicina A ₃ , la Iso-Peroxisomicina A ₁ y T516.	24
3.2.2 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A ₃ e Iso-Peroxisomicina A ₁ del fruto de <i>K. parvifolia</i> .	25
3.2.3 Aislamiento y purificación de la T516 de la raíz de <i>K. parvifolia</i> .	25
3.3 Evaluación de la Pureza Físicoquímica de la Peroxisomicina A ₃ , la Iso-Peroxisomicina A ₁ y T516.	25
3.3.1 Para la Peroxisomicina A ₃ .	25
3.3.2 Para la Iso-Peroxisomicina A ₁ .	25
3.3.3 Para la T516.	25
3.4 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A ₁ contaminadas y sin contaminar.	26
3.4.1 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con Peroxisomicina A ₃ .	26

Capítulo	página
3.4.2 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con Iso-Peroxisomicina A ₁	26
3.4.3 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con T516.	27
4. DISCUSION	29
4.1 Establecimiento de los valores de las Pruebas del Control de Calidad para el lote 75 de la Peroxisomicina A ₁	29
4.2 Elección del fruto de <i>K. parvifolia</i> con mayor concentración de Peroxisomicina A ₃ , Iso-Peroxisomicina A ₁ y T516.	29
4.3 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A ₃ e Iso- Peroxisomicina A ₁	30
4.4 Aislamiento y purificación de la T516	30
4.5 Evaluación de la Pureza Fisicoquímica de la Peroxisomicina A ₃ , la Iso-Peroxisomicina A ₁ y la T516.	31
4.5.1 Pureza Fisicoquímica de la Peroxisomicina A ₃	31
4.5.2 Pureza Fisicoquímica de la Iso-Peroxisomicina A ₁	31
4.5.3 Pureza Fisicoquímica de la T516.	31
4.6 Evaluación estadística de las muestras de Peroxisomicina A ₁ contaminadas y no contaminadas. Establecimiento de los Límites de Detección para cada contaminante natural por las Pruebas del Control de Calidad de la Peroxisomicina A ₁	32
4.6.1 Análisis estadístico de las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con Peroxisomicina A ₃ . Los Límites de Detección para la Peroxisomicina A ₃	32
4.6.2 Análisis estadístico de las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con Iso-Peroxisomicina A ₁ . Los Límites de Detección para la Iso-Peroxisomicina A ₁	33

Capítulo	página
4.6.3 Análisis estadístico de las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con T516. Los Límites de Detección para la T516.	33
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	33
REFERENCIAS..	37
APENDICES.	
APENDICE A.- FIGURAS.	41
APENDICE B.- TABLAS	67
APENDICE C.- GRAFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1. Estructura química de la podofilotoxina aislada de <i>Podophyllum hexandrum</i> y <i>P. peltatum</i>	42
2. Estructura química de la vinblastina y vincristina aisladas de <i>Catharantus roseus</i>	43
3. Distribución geográfica de las especies del género <i>Karwinskia</i> en México.	44
4. Compuestos antracenónicos aislados de <i>Karwinskia humboldtiana</i> por Dreyer y cols., en 1975.	45
5. Diastereoisómero e Isómero de la T514 y T510 aislados de <i>K. parvifolia</i> , <i>K. tehuacana</i> y <i>K. umbellata</i> por Waksman y cols. en 1990 y 1992.	46
6. Isómeros de la Peroxisomicina A ₁ aislados de <i>K. parvifolia</i> por Rivas, en 1995.	47
7. Cromatograma que muestra los compuestos minoritarios presentes durante el proceso de purificación de la Peroxisomicina A ₁	48

Figura	página
8. Espectro UV-Vis de la Peroxisomicina A ₁	49
9. Cromatograma de la Peroxisomicina A ₁	50
10. Espectro UV-Vis de la Peroxisomicina A ₃	51
11. Espectro RMN ¹ H de la Peroxisomicina A ₃	52
12. Cromatograma de la Peroxisomicina A ₃	53
13. Espectro UV-Vis de la Iso-Peroxisomicina A ₁	54
14. Cromatograma de la Iso-Peroxisomicina A ₁	55
15. Espectro UV-Vis de la T516.	56
16. Cromatograma de la T516.	57
17. Espectros UV-Vis de la Peroxisomicina A ₁ y la Peroxisomicina A ₃ sobrepuestos.	58
18. Cromatogramas de las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de Peroxisomicina A ₃	59
19. Espectros UV-Vis de la Peroxisomicina A ₁ y la Iso-Peroxisomicina A ₁ sobrepuestos.	60

Figura**página**

20. Cromatogramas de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de Iso-Peroxisomicina A₁. 61
21. Cambio del t_R de la Iso-Peroxisomicina A₁ respecto a la Peroxisomicina A₁ a través de tiempo del uso de la columna cromatográfica. 62
22. Espectros UV-Vis de la Peroxisomicina A₁ y la T516 sobrepuestos. 63
23. Cromatograma de una mezcla de la Peroxisomicina A₁ y la T516. 64
24. Cromatograma de la T516 utilizando dos longitudes de onda de detección: 310nm y 410nm. 65
25. Cromatogramas de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de T516. 66

LISTA DE TABLAS

Tabla	página
1. Efecto Inhibitorio (CI_{50}) de los compuestos antracénicos sobre la Actividad de Catalasa y el porcentaje de actividad de la enzima a una concentración constante de estos compuestos. .	68
2. Porcentaje de toxinas en diferentes especies del género <i>Karwinskia</i> que existen en el país.	68
3. Los Límites de Detección (% p/p) de los contaminante naturales por las Pruebas del Control de Calidad de la Peroxisomicina A_1 . .	69
4. Diseño sugerido de la etiqueta para anexar a los lotes de Peroxisomicina A_1 producida en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.	70

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica	página
1. Comparación de Absorbancias de las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con diferentes % de Peroxisomicina A ₃ vs Peroxisomicina A ₁ sin contaminar (control negativo).	72
2. Comparación de la Inhibición de Catalasa por las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con diferentes % de Peroxisomicina A ₃ vs Peroxisomicina A ₁ sin contaminar (control negativo).	73
3. Comparación de la Relación de Absorbancias a 280nm/437nm de las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con diferentes % de Iso-Peroxisomicina A ₁ vs Peroxisomicina A ₁ sin contaminar (control negativo).	74
4. Comparación de la Pureza Espectroscópica de las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con diferentes % de Iso-Peroxisomicina A ₁ vs Peroxisomicina A ₁ sin contaminar (control negativo).	75
5. Comparación de la Inhibición de la Catalasa por las soluciones de Peroxisomicina A ₁ contaminadas con diferentes % de Iso-Peroxisomicina A ₁ vs Peroxisomicina A ₁ sin contaminar (control negativo).	76

6. Comparación de la Relación de Absorbancias a 430nm/415nm, 270nm/415nm y 270nm/222nm de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes % de T516 vs Peroxisomicina A₁ sin contaminar (control negativo). . 77

7. Comparación de la Inhibición de la Catalasa por las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes % de T516 vs Peroxisomicina A₁ sin contaminar (control negativo). . 78

1. INTRODUCCION

1.1 El cáncer y su tratamiento.

<Cáncer> es el término general que se aplica a una serie de enfermedades malignas que pueden afectar a partes muy diferentes del organismo. Estas enfermedades se caracterizan por una formación rápida e incontrolada de células anormales, capaces de reunirse para formar un tumor o de proliferar en el organismo, iniciando crecimientos anormales en otros lugares del mismo. Si el proceso no se detiene, puede progresar hasta causar la muerte del organismo. El cáncer se encuentra, en general, en todos los animales superiores, incluyendo el hombre y también en las plantas que desarrollan excrecencias que se asemejan al cáncer¹.

La cirugía, la radiación, los fármacos (agentes quimioterapéuticos) y recientemente la terapia génica e inmunoterapia son las principales formas de tratamiento del cáncer. Los agentes quimioterapéuticos pueden muchas veces proporcionar una mejoría temporal de los síntomas, prolongar la vida y, ocasionalmente, la curación¹.

Un antineoplásico eficaz debe matar o incapacitar las células del cáncer sin producir daño excesivo a las células normales. Este ideal es difícil o, tal vez imposible de conseguir y ello porque los pacientes sufren efectos colaterales cuando están en tratamiento¹. En la actualidad se aconseja la quimioterapia antineoplásica combinada, teniendo en cuenta el mecanismo de acción de diversos agentes, su sinergismo y la fase celular sobre la que actúan^{1,2}.

Frecuentemente, sin embargo, la dosis eficaz de estos agentes probados resultó ser prácticamente la dosis tóxica, hecho atribuido a la poca selectividad del producto. Las síntesis, consistentes en modificaciones de fármacos conocidos, continúan siendo un importante campo de investigación; sin embargo, un gran volumen de trabajo de síntesis ha aportado pocas novedades sobre las moléculas-prototipo^{1,3}.

Los estudios recientes sobre compuestos de origen vegetal, que actúan como inhibidores de tumores, están proporcionando una serie de nuevas estructuras. Muchas de éstas, son sumamente complejas, por lo que resulta inverosímil que tales compuestos pudiera ser sintetizados como intento empírico de hallar nuevos fármacos^{1,3,4,5}.

1.2 El papel de las plantas en el tratamiento del cáncer.

Indudablemente, el reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal aún por descubrir. Un gran número de plantas son analizadas constantemente en relación a su posible valor farmacológico (particularmente por sus propiedades antiinflamatorias, hipotensoras, hipoglucémicas, amebicidas, citotóxicas, antibióticas y antiparkinsonianas)¹.

Como resultado de los procedimientos modernos de aislamiento y de experimentación farmacológica, drogas nuevas encuentran su camino hacia la Medicina, en estado de sustancia purificadas, más que en forma de antiguas preparaciones galénicas. La utilización de compuestos puros aislados, incluyendo fármacos sintéticos, no carece de limitaciones y en años recientes, ha renacido un inmenso interés en la Medicina hacia los sistemas fitoterapéuticos, tan estrechamente relacionados con los recursos vegetales^{1,3}.

Las plantas han sido utilizadas en el tratamiento de las enfermedades malignas durante siglos; si realizamos una revisión global a la literatura científica, tanto antigua como moderna, encontraremos que se describen plantas utilizadas contra el cáncer¹.

El podofilo fue utilizado desde hace más de 2,000 años por los chinos como fármaco antitumoral; las resinas de esta planta *Phodophyllum hexandrum* y la especie americana relacionada *P. peltatum* han dado lugar al aislamiento de diversos lignanos y sus heterósidos, que poseen actividad antitumoral (Fig. 1)¹.

El mayor éxito en plantas superiores utilizadas en la quimioterapia del cáncer, lo constituyen los alcaloides del *Cantharantus roseus*. Las investigaciones sobre esta planta, fueron estimuladas por su mención en la terapéutica popular, pero no como remedio contra el cáncer, sino en el tratamiento de la diabetes. No se detectó actividad hipoglucémica, pero la susceptibilidad para la infección bacteriana de los animales de experimentación tatados, indujo a los investigadores a emprender un extenso trabajo sobre los posibles principios inmunosupresores causantes de estos efectos. Como consecuencia se aislaron diversos alcaloides indólicos dímeros, que mostraron actividad antileucémica. Dos de ellos, vinca-leucoblastina (vinblastina) y leucocristina (vincristina), se obtienen en la actualidad de la *Vincarosea* que se emplean tanto solos como en combinación con otras formas terapéuticas para el tratamiento del cáncer^{1,6}(Fig 2).

Hacia finales de 1950, comenzó una revisión intensiva de plantas, microorganismos y animales marinos, respecto a su actividad antitumoral, debido principalmente, a que el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos inició un gran programa de detección selectiva^{1,3}.

Al principio se adoptó un sistema de selección de las plantas al azar, ya que pueden encontrarse nuevos compuestos en cualquier especie del reino vegetal o animal. Evidentemente, este tipo de selección al azar por <rastreo> masificado es una operación muy costosa y probablemente, justificada tan sólo en determinadas áreas, en las cuales la disponibilidad de fármacos es francamente inadecuada e ineficaz. El cáncer puede considerarse incluido en esta categoría^{1,3}.

Actualmente, el aislamiento de componentes menores, biológicamente activos, a partir de un extracto crudo de planta, implica el empleo de técnicas que difieren de las convencionales en Fitoquímica^{1,3}.

En los estudios sistemáticos recientes, cada porción de la planta y cada fracción del extracto se ensayan biológicamente antes de haber sido aislado y caracterizado componente alguno; usualmente, tan sólo las fracciones que muestran actividad biológica son estudiadas posteriormente^{1,3,4,5}.

1.3 Los estudios fitoquímicos de plantas del género *Karwinskia*.

En nuestro medio podemos mencionar como ejemplo de lo anteriormente expuesto, los compuestos aislados de plantas del género *Karwinskia*. El género *Karwinskia* es un taxón perteneciente a la familia de las Rhamanceae, constituido básicamente de arbustos y pequeños árboles, que incluye 15 especies encontradas desde Texas hasta Colombia⁷ (Fig. 3). La especie más estudiada es la *K. humboldtiana* y los efectos tóxicos de la planta se conocen desde hace mucho tiempo.

En el siglo XVIII, Clavijero⁸ registró los efectos tóxicos que se presentan al ingerir fruto de *K. humboldtiana*. Shaver⁹ en 1966, estableció que el compuesto neurotóxico se encuentra en el polvo amarillo, lo cual fue posteriormente confirmado por Kim y Camp⁹ en 1972. Dreyer y cols.¹⁰ en 1975, aislaron y caracterizaron de *K. humboldtiana* cuatro compuestos polifenólicos responsables de las propiedades neurotóxicas, que de acuerdo a su peso molecular se denominan: T496, T514, T516 y T544 (Fig. 4).

En 1981, se inició en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina una línea de investigación sobre las plantas del género *Karwinskia*.

Las toxinas anteriormente mencionadas fueron aisladas y purificadas por Guerrero y cols.¹¹; posteriormente Bermúdez y cols.^{12,13} realizaron pruebas de toxicidad aguda *in vivo* de diferentes especies de animales tanto del fruto de *K. humboldtiana* como de las toxinas purificadas. En estos estudios demostraron que la T544 es la responsable de la neurotoxicidad, la T514 es selectivamente tóxica para células de hígado y pulmón y la T496 causa un cuadro diarreico.

Fue entonces que Piñeyro^{14,15} planteó la hipótesis de toxicidad selectiva de células neoplásicas *in vitro*, confirmada inicialmente en 11 líneas celulares humanas: 3 benignas y 8 malignas; se compararon los resultados obtenidos con los de 5 agentes antineoplásicos conocidos. Así reportó en su tesis doctoral que la T514 es más tóxica para las células neoplásicas que para las benignas; dichos resultados fueron corroborados en la República de Alemania y en el N.C.I. de E.U.A. En base a estos resultados se otorgó una patente de uso como agente antineoplásico en la C.E.E., E.U.A. y Japón¹⁶.

Paralelamente y debido a la necesidad de obtención de mayor cantidad de T514 y para conocer más profundamente la Fitoquímica del género, Waksman y cols.¹⁷ realizaron un estudio exhaustivo de otras especies del género *Karwinskia* presentes en la República Mexicana. El estudio de toxicidad aguda se realizó con 9 especies del género (las reportadas hasta entonces en México), resultando que las más tóxicas fueron *K. humboldtiana*, *K. umbellata* y *K. parvifolia*. El estudio químico de los extractos clorofórmicos por CCF-Reflectancia, reportó que las especies con mayor cantidad de T514 fueron *K. subcordata* y *K. parvifolia*.

En estudios posteriores se concluyó que la *K. parvifolia*, es la mejor fuente de T514 por el contenido menor de "contaminantes" y mayor porcentaje de T514. Ésta es por tanto la especie que actualmente se utiliza como fuente de obtención¹⁸ (Tabla 1).

Por otro lado, los estudios fitoquímicos de los extractos semipolares de los frutos de *K. parvifolia*, *K. tehuacana* y *K. umbellata*, permitieron aislar e identificar otros 3 compuestos antracénicos: un diastereoisómero de la T514, un isómero posicional de la T514 y la T510^{19,20}(Fig. 5).

Entre los intentos por encontrar el mecanismo de acción de la T514 se puede mencionar el efecto sobre la lipidoperoxidación microsomal hepática en experimentos realizados por Garza²¹. Aunque aún no se conoce su mecanismo de acción, ciertas observaciones experimentales permiten señalar que no actúa sobre el núcleo de las células como la mayoría de los antineoplásicos. Los estudios posteriores realizados por Sepúlveda y cols.²² revelaron que la T514 afecta irreversible y selectivamente los peroxisomas de las levaduras metilotróficas, por este motivo se le ha llamado Peroxisomicina A₁. Los estudios *in vitro* realizados por Moreno y cols.²³ demostraron una Inhibición no competitiva de la Catalasa por la Peroxisomicina A₁ y compuestos relacionados estructuralmente (Tabla 2).

1.4 Control de Calidad de un producto de interés farmacológico: la Peroxisomicina A₁.

Dado el interés farmacológico de la Peroxisomicina A₁ con uso antineoplásico probable, una vez aislada y purificada es sometida a un estricto Control de Calidad. Dicho control se realiza tanto desde el punto de vista Fisicoquímico como Biológico.

Las referencias bibliográficas informan que la valoración de un fármaco, es de importancia considerable. Esta operación comprende la identificación del material y la determinación de su calidad (pureza) y, si se encuentra alterado, conocer la naturaleza del adulterante. Algunos factores que afectan la calidad son la estirpe del vegetal, la época de recolección, los métodos de desecación y conservación utilizados¹.

Para la evaluación de la **Pureza Fisicoquímica** de la Peroxisomicina A₁ se realizan actualmente la medición del Punto de Fusión Inicial y Final que deben de ser constantes; otra prueba es la Pureza Espectroscópica, ésta se realiza al monitorear las Absorbancias a varias longitudes de onda: 222nm, 270nm, 415nm y 430 nm así como razones de las mismas: 430nm/415nm, 270nm/415nm, 270nm/ 222nm. Las razones se emplean para evitar las variaciones de Absorbancia debido a errores en el peso de la muestra, ya que:

$$\begin{array}{l} \text{entonces} \quad A_{\lambda_1} = \epsilon_{\lambda_1} b c \quad \text{y} \quad A_{\lambda_2} = \epsilon_{\lambda_2} b c \\ \quad \quad \quad A_{\lambda_1} / A_{\lambda_2} = \epsilon_{\lambda_1} / \epsilon_{\lambda_2} = \text{constante} \quad b c \end{array}$$

La Pureza Cromatográfica se evalúa utilizando el análisis por CCF-FN y CCF-FR mediante la observación de una sola mancha de Rf establecido bajo la lámpara de luz UV a 254 nm y 369 nm y en el Vis por observación directa. Así también se utiliza la CLAR-FR para observar la aparición de un solo pico de t_R establecido. Se evalúa la Pureza Espectroscópica de dicho pico empleando un detector de arreglo de fotodiodos, por medio del cual se genera el espectro de absorción completo, de tal manera que a las dimensiones habituales de tiempo y Absorbancia, se agrega una tercera, la longitud de onda^{24,25} esto permite apreciar detalles que escapan a detectores convencionales.

En nuestro caso se monitorean varias longitudes de onda: 269nm, 310nm y 410 nm, y se realiza la superposición de espectros así como la gráfica de las relaciones de Absorbancia a las longitudes de onda antes mencionadas.

La **Pureza Biológica** incluye el ensayo de la disminución de Actividad de la Catalasa según el método de Aebi²⁶ y la evaluación de la Citotoxicidad empleando el método desarrollado por Martínez y cols.²⁷ que utiliza la línea de células benignas de hígado de Chang y la línea maligna de hepatoma HEPLC/PRF/5, a las cuales se les determina la CT_{50} .

Las Pruebas incluidas en el Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁.

Pruebas	Pruebas
Fisicoquímicas	Biológicas
a) Punto de Fusión inicial	g) Inhibición de la Catalasa
b) Punto de Fusión final	h) Citotoxicidad
c) CCF-FN	
d) CCF-FR	
e) Pureza Espectroscópica	
f) CLAR-FR	

En un estudio realizado por Waksman y cols.²⁸ que consistió en aplicar estas pruebas a varios lotes puros de Peroxisomicina A₁ y a continuación analizar los resultados estadísticamente, se obtuvieron los valores que nos permitirían calificar en adelante los lotes de Peroxisomicina A₁ tanto desde del punto de vista Fisicoquímico como Biológico. Los límites de tolerancia determinados en el estudio referido fueron:

Pruebas	Valores
Fisicoquímicas	
a) Punto de Fusión inicial	179,24 ± 1,54 °C
b) Punto de Fusión final	181,37 ± 1,20 °C
c) CCF-FN	Observación visual
d) CCF-FR	Observación visual
e) Pureza Espectroscópica	A $\frac{430\text{nm}}{415\text{nm}}$ = 1,003 ± 0,003
f) CLAR-FR	Registro de un solo pico y evaluación de la pureza espectroscópica.

Pruebas	Valores
Biológicas	
g) Inhibición de Catalasa	% Inhibición = 46,58 ± 1,32
h) Citotoxicidad	CT ₅₀ Chang = 56- 80 µg/ mL
	CT ₅₀ HEPLC/PRF/5=2,5-10 µg/mL

Al realizar estudios fitoquímicos de los extractos del fruto de *K. parvifolia* recolectada en los últimos años, se identificaron tres nuevos compuestos que presentan por CLAR-FR C8 y C18, t_R muy semejantes a la Peroxisomicina A₁. Estos compuestos fueron aislados e identificados por Rivas²⁹: un nuevo diastereoisómero de Peroxisomicina A₁, un isómero posicional de la Peroxisomicina A₁ y la T516 (Fig. 6).

Debido a la identificación de isómeros nuevos de la Peroxisomicina, se optó utilizar una nueva nomenclatura. Se denomina Peroxisomicina a todos los diastereoisómeros de la T514 aislada originalmente por Dreyer, es decir, con sitio de unión 7, 10'; Iso-Peroxisomicina a los isómeros posicionales con unión 7-7', la numeración corresponde al orden de aislamiento e identificación de los mismos y siguiendo la nomenclatura establecida por Steglich y Glid³⁰ se puede denominar como atropoisómero de la serie A a aquellos que presentan efecto Cotton positivo en las curvas de Dicroísmo Circular y como atropoisómeros de la serie B a aquellos que presentan efecto Cotton negativo; por lo tanto, la letra A ó B está dada por el resultado experimental obtenido por las curvas de Dicroísmo Circular en los compuestos que fue factible hasta la fecha realizar. Así tenemos:

Nomenclatura Previa	Nomenclatura Actual
T514	Peroxisomicina A ₁
Diastereoisómero 1 de T514	Peroxisomicina A ₂
Diastereoisómero 2 de T514	Peroxisomicina A ₃
Isómero Posicional de T514	Iso-Peroxisomicina A ₁

La Peroxisomicina A₂ se separa muy bien de la Peroxisomicina A₁ en CLAR FR, sin embargo la Peroxisomicina A₃, la Iso-Peroxisomicina A₁ y la T516 al tener t_R tan cercanos generan problemas durante la purificación de Peroxisomicina A₁^{29,31} (Fig. 7).

Para la última etapa de la purificación de la Peroxisomicina A₁ se utiliza el método de CLAR-FR-C18, así que la posibilidad de que estos contaminantes no sean eliminados en su totalidad constituye una consideración importante. Su presencia podría originar que el fármaco no cumpla con los valores establecidos en el Control de Calidad.

Desde este punto de vista se plantea como esencial el conocimiento del Límite de Detección de cada una de las pruebas incluidas en el Control de Calidad para la Peroxisomicina A₃, para la Iso-Peroxisomicina A₁ y para la T516; para lo cual debemos recordar que la **Sensibilidad**^{24,32} de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de un analito que puede producir un resultado significativo y, el **Límite de Detección**^{24,32} corresponde, a la menor concentración de un analito que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, bajo las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración: %, ppm, ppb³².

1.5 Objetivos del Trabajo.

1.5.1 Objetivo General

Determinación del Límite de Detección en cada una de las pruebas incluídas en el Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁ en lotes de ésta conteniendo Peroxisomicina A₃, Iso-Peroxisomicina A₁ o T516.

1.5.2 Objetivos Específicos

- 1.- Determinar los valores de las pruebas del Control de Calidad (excluyendo el ensayo de la Citotoxicidad) para la muestra de Peroxisomicina A₁ proporcionada como químicamente pura y biológicamente activa, que se use en el resto de proyecto.
- 2.- Aislar y purificar la Peroxisomicina A₃, la Iso-Peroxisomicina A₁ y la T516 del fruto de *K. parvifolia*.
- 3.- Determinar la Pureza Fisicoquímica de la Peroxisomicina A₃, la Iso-Peroxisomicina A₁ y la T516.
- 4.- Establecer los valores para cada una de las pruebas realizadas en el Objetivo No. 1, cuando la Peroxisomicina A₁ esté contaminada con distintas concentraciones de Peroxisomicina A₃, Iso-Peroxisomicina A₁ o T516.
- 5.- Comparar y valorar estadísticamente los resultados obtenidos, para establecer los Límites de Detección de cada prueba para cada uno de los contaminantes naturales.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 *Material Biológico.*

Se obtuvo **fruto de *K. parvifolia*** proveniente de los municipios de: Bajosori, Cerro Prieto, Guayabitos, Loretillo, El Sauz, Tobocahui en el estado de Sinaloa y Melchor Ocampo Sonora, recolectado por el Ing. Rubén Luján en el año de 1992.

2.2 *Material y Equipo.*

2.2.1 *Material General.*

La **Peroxisomicina A₁** químicamente pura y biológicamente activa fue proporcionada por el personal del laboratorio de producción, del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Los **solventes** grado analítico se utilizaron para las extracciones, CCF, CC Gravitacional, CC de Baja Presión, CC Flash; los solventes grado espectroscópico se utilizaron para las mediciones espectrales y los solventes grado cromatográfico fueron utilizados en el método de CLAR.

Para la determinación del grado de **Inhibición de la Catalasa** se utilizó:

- Catalasa de hígado bovino Sigma (E.C. 1. 11. 1.6)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30 % (v/v) Sigma.
- Solución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄), 50mM pH=7.4.
- Cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor y 1 mL de capacidad.

2.2.2 *Equipo.*

Balanza Analítica: Sartorius Basic.

Vortex: Pulse Vortexer Glass-Col

Agitador Mecánico: Disaga.

Molino tipo: Thomas-WILEY, LABORATORY MILL, modelo 4, malla 2 mm.

Medidor de pH: Beckman ϕ 61

Centrífuga: Beckman GPKR con controlador de temperatura

Microcentrífuga: IEC Micro-MB

Medidor del Punto de Fusión: Aparato Electrothermal.

Rotavapor: Aparato Buchi con control de temperatura.

RMN: Bruker 400 MHz.

Espectro UV-Vis: Espectrofotómetro UV-Vis Beckman DU 7500 con arreglo de diodos equipado con paquete de cinética enzimática y controlador de temperatura Peltier.

Para la realización de las **Cromatografías** utilizamos:

A) CCF Fase Normal:

Fase estacionaria: Cromatofolios AL de Sílica gel 60 F254, espesor de capa 0.2 mm, Merck.

Fase móvil: Benceno:Acetona 3:1 con 0.1% de HAc.

Observación al UV-Vis con lámpara UV: Gelman Sciences, Inc. Modelo No. 52438 de 253.7 y 375 nm.

B) CCF Fase Reversa:

Fase estacionaria: Cromatoplasmas de Sílica gel RP-18 F 254, Merck.

Fase móvil: Metanol:Agua 7:3.

C) CC Flash:

Fase estacionaria: Sílica gel 60 para CC, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck.

Fase móvil: Benceno:Acetona 3:1, 2:1, 1:1, 0:1 con 0.1% de HAc.

D) CC Gravitacional:

Fase estacionaria: Sílica gel 60 para CC, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck.

Fase móvil: Benceno:Acetona 12:1, 10:1, 8:1, 7:1, 5:1, 3:1, 0:1 con 0.1% de HAc.

E) CC de Baja Presión:

Fase estacionaria: Columna Lobar Lichroprep RP-18 (0.040-0.063 mm), Merck

Fase móvil: Metanol:Agua 9:1, Isocrático.

Flujo: 1.3 mL/min.,

F) CLAR Preparativo:

Se utilizó un cromatógrafo Waters Prep LC 2000.

Fase estacionaria: Columna 8 mm X 100 mm Radial, PakTM Liquid Chromatography cartridge, tipo 18 M8BC 10mm.

Fase móvil: MeOH:H₂O:HAc, 65:35:3.2. Isocrático, flujo de 75 mL/min, $\lambda = 440$ nm.

G) CLAR Analítico:

Cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 1090 con detector de arreglo de diodos.

Fase Móvil: A) MeOH

B) H₂O:ACN:HAc, 70:30:1.6.

Condiciones:

a) Columna FR ODS de 100 X 2.1 mm con tamaño de partícula de 5 mm A-B, 65:35 hasta el minuto cuatro y se incrementó en forma gradual el % de A hasta el 100% en el minuto seis.

b) Columna FR MOS de 100 X 2.1 mm con tamaño de partícula de 5 mm A-B, 50:50 hasta el minuto cuatro y se incrementó en forma gradual el % de A hasta el 100% en el minuto seis.

2.3 Métodos.**2.3.1 Control de Calidad del Lote 75 de Peroxisomicina A₁.**

El lote # 75, con fecha de obtención del 11 de Diciembre de 1995 fue elegido para trabajar durante el desarrollo experimental, por lo cual fue sometido a todas las pruebas incluidas en el Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁ (Estrategia No.1).

2.3.1.1 Medición del Punto de Fusión Inicial y Final.

Tres muestras de Peroxisomicina A₁ del lote # 75 se desecaron por 3 hr (tiempo previamente establecido como suficiente para este ensayo); se determinó el Punto de Fusión Inicial y Punto de Fusión Final. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

2.3.1.2 Evaluación de la Pureza Espectroscópica.

Se prepararon 3 soluciones metanólicas de Peroxisomicina A₁ con una concentración de 3.89×10^{-6} M; a estas soluciones se les hizo un barrido espectral. Las Absorbancias a 222 nm, 270 nm, 415 nm y 430 nm fueron determinadas. Posteriormente se calcularon las siguientes relaciones de Absorbancias: 430nm/415nm, 270nm/415nm y 270nm/222nm.

Todas las mediciones fueron efectuadas por triplicado.

2.3.1.3 Análisis por CCF-FN.

Se evaluó la pureza cromatográfica del lote observando las manchas a 253.7 y 375 nm; se realizaron por triplicado.

2.3.1.4 Análisis por CCF-FR.

Se evaluó la pureza cromatográfica del lote por triplicado.

2.3.1.5 Análisis por CLAR-FR.

Se prepararon tres soluciones etanólicas de Peroxisomicina A₁ de 2 mg/mL, se tomaron 100 μ l de esta solución que se secaron con N₂ se resuspendieron en 1 mL de MeOH se filtraron utilizando filtros Milipore tipo HV con un tamaño de poro 0.45 μ m, y se inyectaron 5 μ l.

Se evaluó la pureza cromatográfica utilizando las condiciones a), es decir la aparición de un solo pico a un t_R establecido y la pureza espectroscópica por medio de la superposición de espectros y la relación de Absorbancias a las distintas longitudes de onda^{24,31}.

2.3.1.6. Ensayo de la Inhibición de la Catalasa.

Para medir la inhibición de la actividad de la Catalasa se siguió durante seis minutos la disminución de la concentración del H₂O₂ por minuto a una λ de 240 nm, pH=7.4 y a una temperatura de 25°C²⁶.

a) La determinación de la Actividad de la Catalasa.

En una cubeta de cuarzo de 1 mL se agregaron las siguientes soluciones:

- 950 μ L de solución amortiguadora de fosfatos de potasio (50 mM), pH= 7.4.
- 40 μ L de la solución de catalasa (dilución 1:70 de la solución patrón de catalasa 10 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos).
- Se agitó y se leyó como blanco de reactivos.
- Se inició la reacción al agregar 10 μ L de H₂O₂ (dilución 1:5 de solución patrón al 30% en una solución amortiguadora de fosfatos).
- Se mezcló y se leyó la Absorbancia del H₂O₂ a 240 nm.

Las determinaciones se hicieron por triplicado para obtener el valor de la media.

La Actividad de la Catalasa se expresó como U/mL (μ M de peróxido de hidrógeno utilizado/min/mL). Estas mediciones fueron realizadas en el espectrofotómetro Beckman DU 7500.

b) La determinación del grado de inhibición de la Actividad de la Catalasa.

En una cubeta de cuarzo de 1 mL se agregaron las siguientes soluciones:

- 930 μ L de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH=7.4.
- 40 μ L de la solución de catalasa (dilución 1:70).
- 20 μ L de la solución de Peroxisomicina A₁ en EtOH 3,89 x 10⁻⁶ M.

- Se inició la reacción al agregar 10 μL de H_2O_2 (dilución 1:5 de la solución patrón al 30% en una solución amortiguadora de fosfatos).
- Se agitó y se leyó a 240 nm durante seis minutos.

Lo anterior se hizo por triplicado para cada caso y en base a ello se calculó el grado de Inhibición de la Catalasa que causa la adición de cada uno de los compuestos en estudio.

2.3.2 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A₃, Iso-Peroxisomicina A₁ y T516.

Con el fin de encontrar el fruto de *K. parvifolia* que tuviese la mayor concentración de Peroxisomicina A₃, Iso-Peroxisomicina A₁ y T516, se realizó el siguiente ensayo con frutos de *K. parvifolia* de diferentes lugares de colecta. (Diagrama 1).

2.3.2.1 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A₃ e Iso-Peroxisomicina A₁.

Se utilizó la técnica de Rivas²⁹ modificada (Diagrama 2) empleando 406.3 g de fruto seco de *K. parvifolia* recolectado en Bajosori y 448.9 g en Loretillo, dando un total de 855.2 g de fruto; los cuales se molieron obteniendo un peso final de 761.5 g.

Se colocaron en una columna para realizar una extracción con solventes orgánicos por percolación:

- 1º) Eter de Petróleo
- 2º) Acetato de Etilo

Posteriormente se realizaron extracciones con MeOH utilizando un agitador mecánico. Todos los solventes se recuperaron por destilación al vacío y a una temperatura menor de los 40° C.

2.3.2.2 Aislamiento y purificación de la T516.

Para obtener la T516 se trabajó con un extracto de raíz, pues ésta no contiene Peroxisomicina A₁. Este extracto fue trabajado y obtenido por Benavides³³ de acuerdo al Diagrama 3.

2.3.3 Evaluación de la Pureza Fisicoquímica de Peroxisomicina A₃, Iso-Peroxisomicina A₁ y T516.

Para evaluar la Pureza Fisicoquímica de los compuestos aislados según los Diagramas 2 y 3 se realizó lo siguiente:

2.3.3.1 Para la Peroxisomicina A₃.

- a. Pureza Espectroscópica.
- b. Espectro de RMN ¹H.
- c. Pureza Cromatográfica: -CCF-FN
-CCF-FR
-CLAR-FR condiciones a)

2.3.3.2 Para la Iso-Peroxisomicina A₁.

- a. Punto de Fusión.
- b. Pureza Espectroscópica
- c. Pureza Cromatográfica: -CCF-FN
-CCF-FR
-CLAR-FR condiciones a)

2.3.3.3 Para la T516.

- a. Pureza Espectroscópica
- b. Pureza Cromatográfica: -CCF-FN
-CCF-FR
-CLAR-FR condiciones a)
-CLAR-FR condiciones b)

2.3.4 Contaminación de las muestras de Peroxisomicina A₁.

2.3.4.1 Preparación de soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con Peroxisomicina A₃ a distintas concentraciones porcentuales (p/p).

La Peroxisomicina A₁ (lote 75) se secó por 3 hr; se pesaron 3 muestras de 2 mg cada una. Se aforaron a 1 mL con EtOH grado espectroscópico (2mg/mL). También se preparó una solución etanólica de 2 mg/ mL de la Peroxisomicina A₃.

Se tomaron los μ L necesarios de la Peroxisomicina A₁ y de la Peroxisomicina A₃ para tener una solución contaminada al 5% con esta última, con un volumen final de 1mL. De esta manera se prepararon dos soluciones contaminadas y una tercera nos sirvió como un control negativo.

Una vez preparadas las soluciones contaminadas, se sometieron al igual que el control negativo a las pruebas que incluye el Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (Estrategia 2).

Según los resultados obtenidos al contaminar con 5% de la Peroxisomicina A₃, procedimos a preparar soluciones con mayor o menor porcentaje de contaminación.

2.3.4.2 Preparación de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con Iso-Peroxisomicina A₁ a distintas concentraciones porcentuales (p/p).

La Peroxisomicina A₁ (lote 75) se secó por 3 hr; se pesaron 3 muestras de 2 mg cada una. Se aforaron a 1 mL con EtOH grado espectroscópico (2mg/mL). También se preparó una solución etanólica de 2 mg/ mL de la Iso-Peroxisomicina A₁.

Se tomaron los μ L necesarios de la Peroxisomicina A₁ y de la Iso-Peroxisomicina A₁ para tener una solución contaminada al 5% con esta última, con un volumen final de 1mL. De esta manera se prepararon dos soluciones contaminadas y una tercera nos sirvió como un control negativo.

Una vez preparadas las soluciones contaminadas, se sometieron al igual que el control negativo a las pruebas que incluye el Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Según los resultados obtenidos al contaminar con 5% de la Iso-Peroxisomicina A₁, procedimos a preparar soluciones con mayor o menor porcentaje de contaminación.

2.3.4.3 Preparación de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con T516 a distintas concentraciones porcentuales (p/p).

La Peroxisomicina A₁ (lote 75) se secó por 3 hr; se pesaron 3 muestras de 2 mg cada una. Se aforaron a 1 mL con EtOH grado espectroscópico (2mg/mL). También se preparó una solución etanólica de 1 mg/mL de la T516.

Se tomaron los μ L necesarios de la Peroxisomicina A₁ y de la T516 para tener una solución contaminada al 5% con esta última, con un volumen final de 1mL. De esta manera se prepararon dos soluciones contaminadas y una tercera nos sirvió como un control negativo.

Una vez preparadas las soluciones contaminadas, se sometieron al igual que el control negativo a las pruebas que incluye el Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Según los resultados obtenidos al contaminar con el 5% de la T516, procedimos a preparar soluciones con mayor o menor porcentaje de contaminación.

2.3.5 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A₁ contaminadas y sin contaminar.

Las pruebas estadísticas utilizadas para analizar los resultados obtenidos fueron:

- Prueba t de Student para diferencia de medias de dos poblaciones
- Prueba t de Student para diferencia de proporciones de dos poblaciones.

Con una $p=0,005$ y valores de $t = \pm 2,81$ para ensayos de dos colas^{34,35,36}.

DIAGRAMA 1

Elección del fruto de *K. parvifolia* con mayor concentración de Peroxisomicina A3, Iso-Peroxisomicina A1 y T516

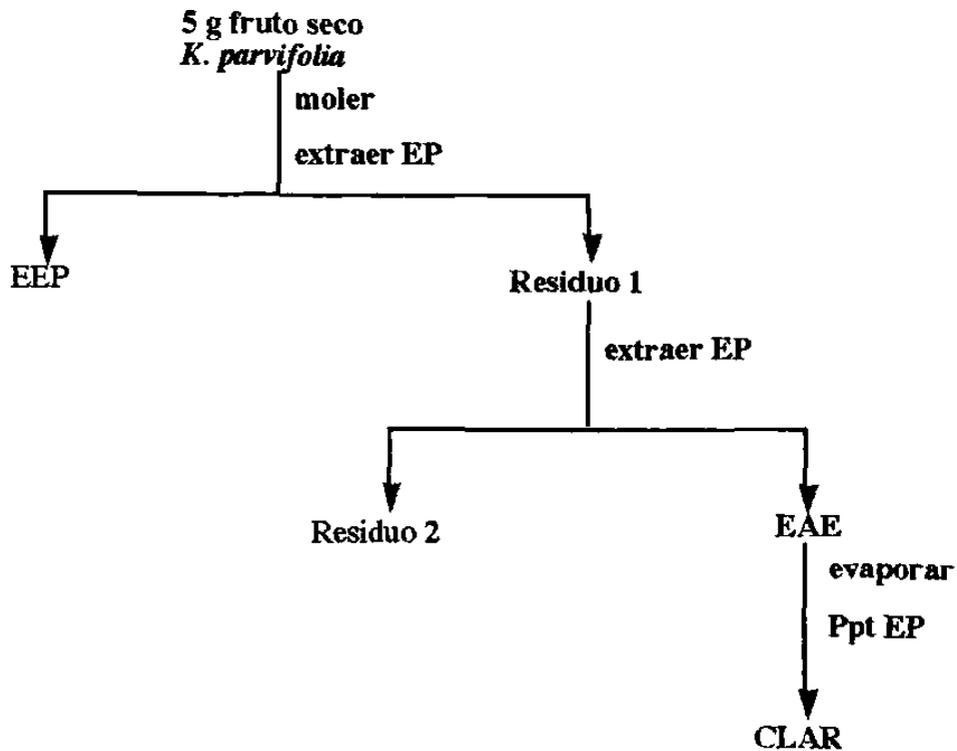
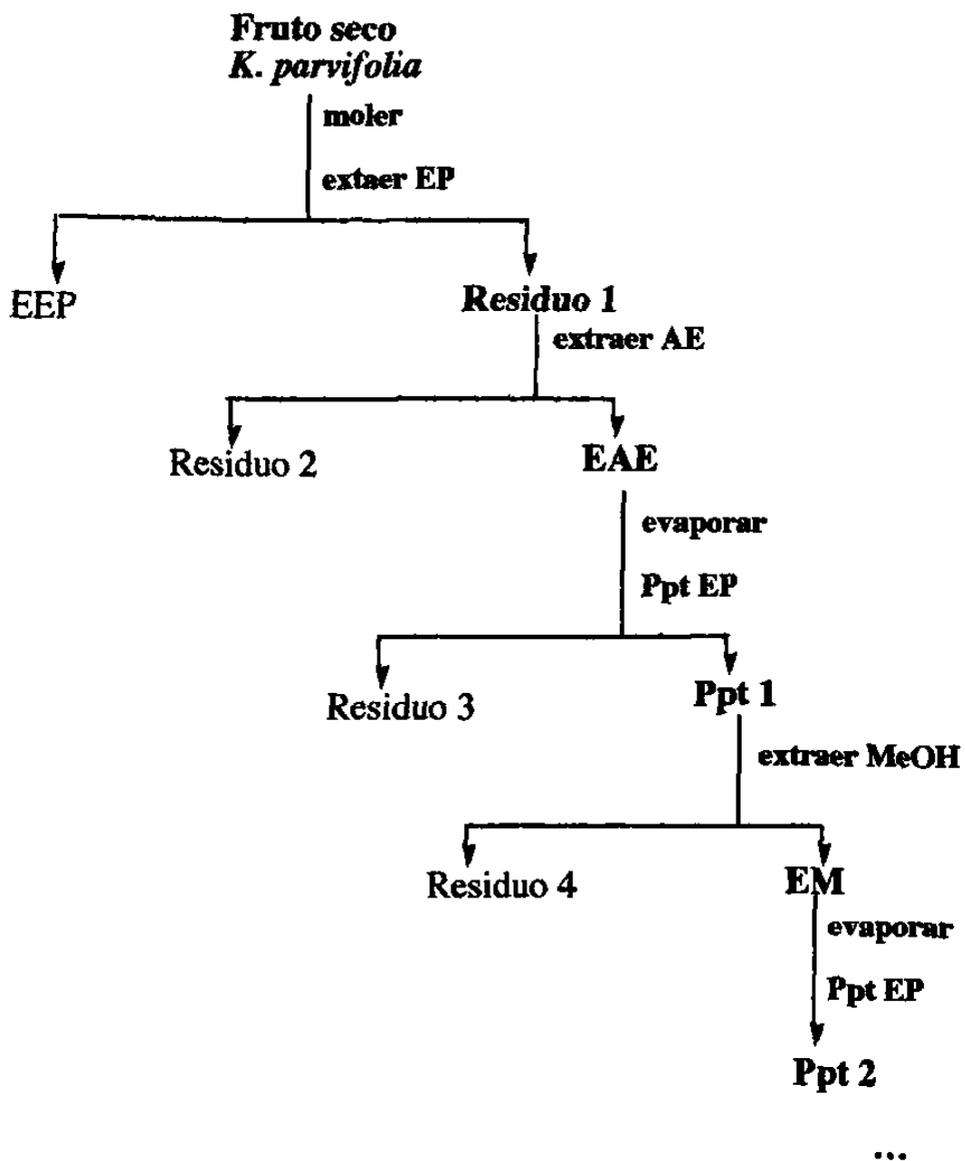


DIAGRAMA 2

Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A₃ y la Iso-Peroxisomicina A1 del fruto de *K. parvifolia*



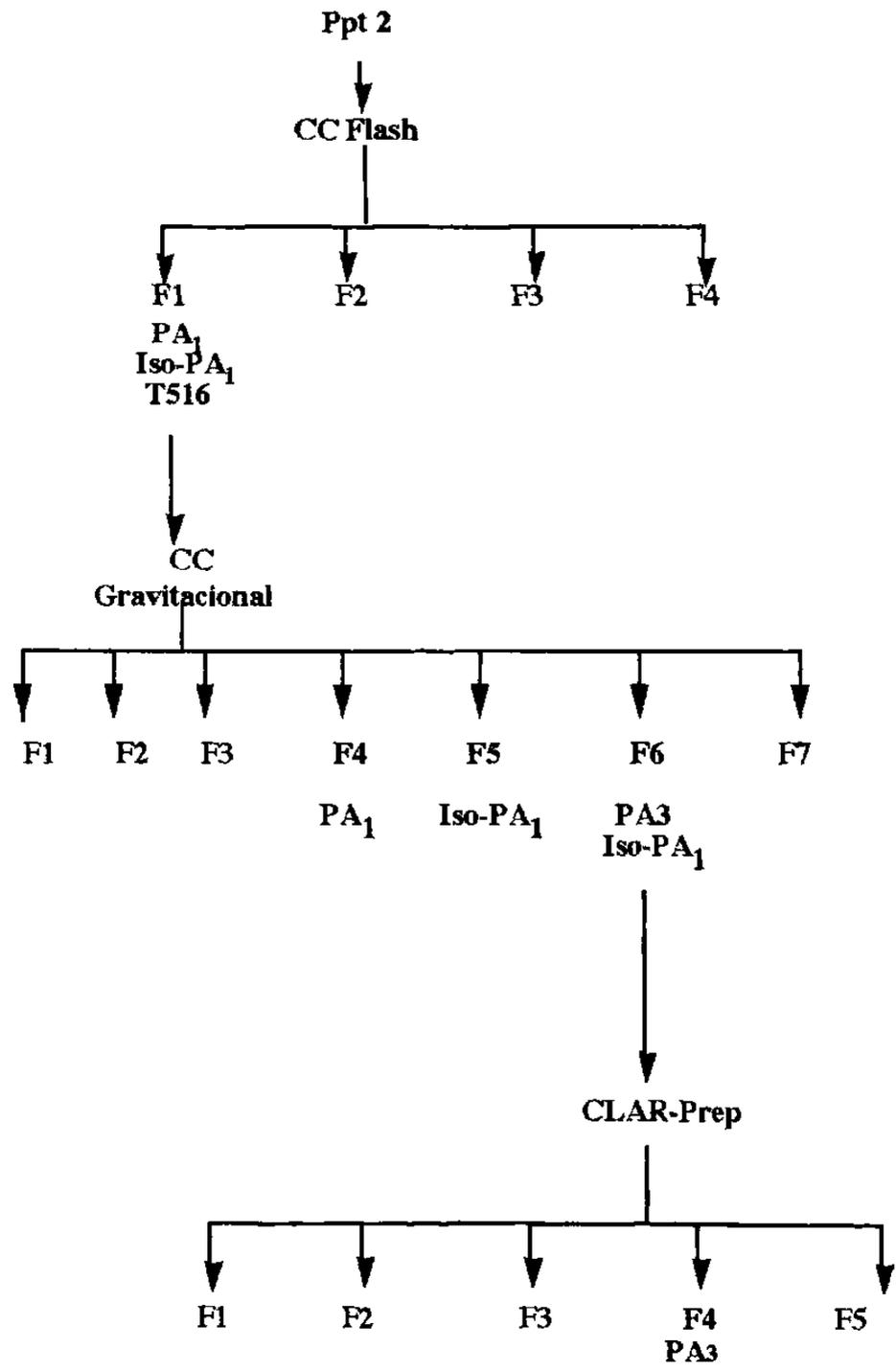
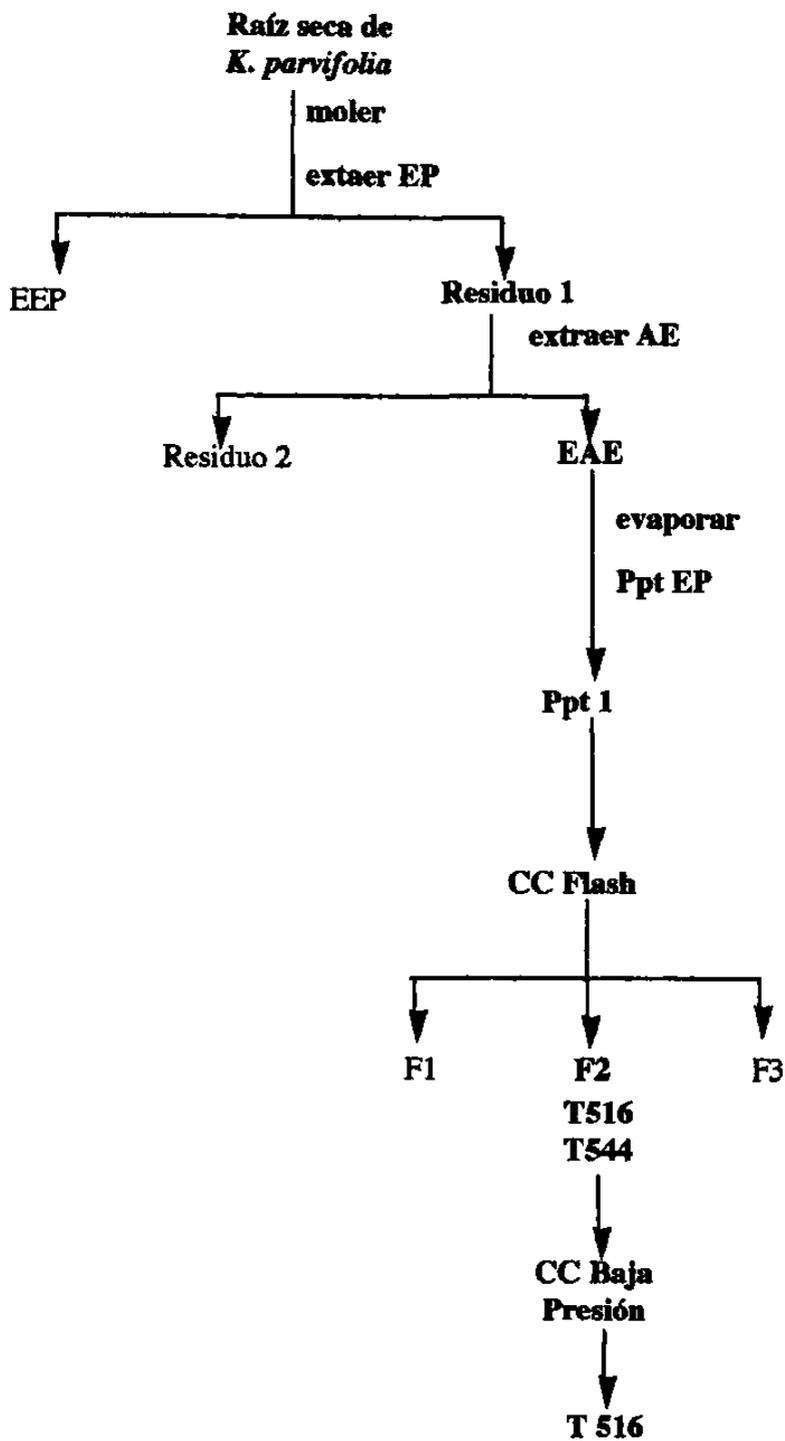


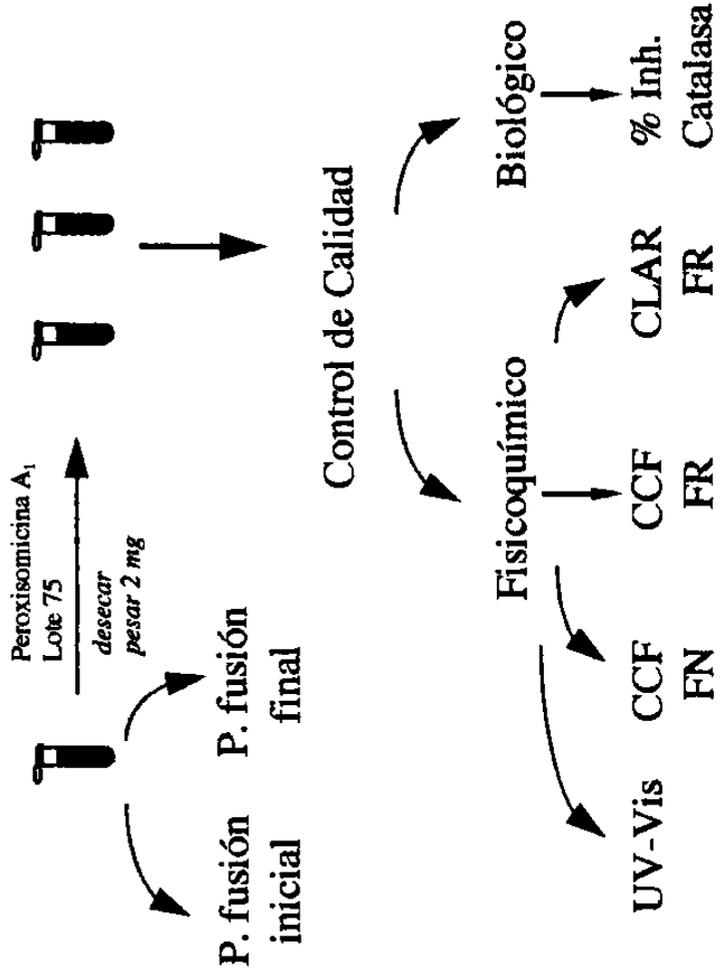
DIAGRAMA 3

**Aislamiento y purificación de la T516
de raíz de *K. parvifolia***



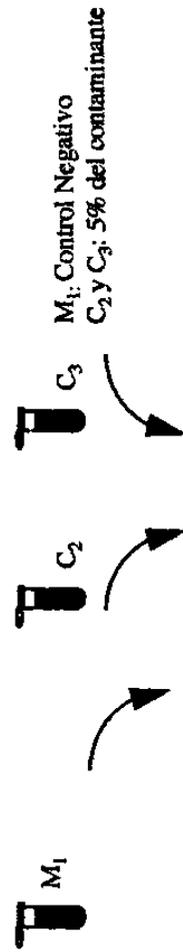
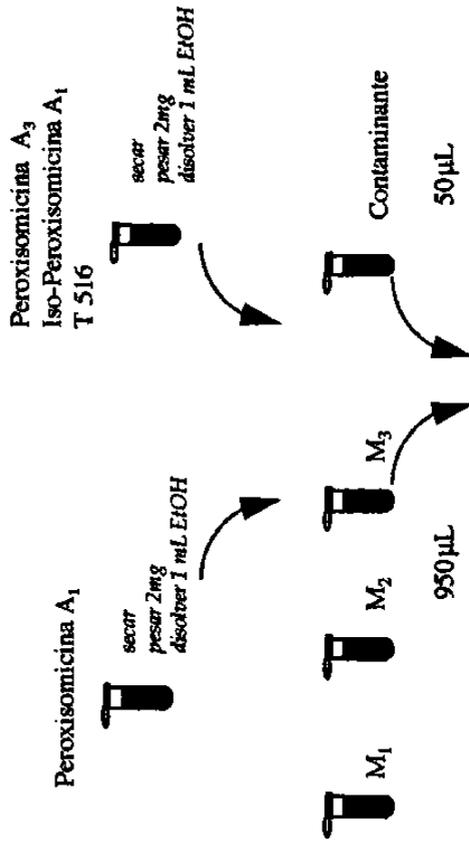
Estrategia No. 1

Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁



Estrategia No. 2

a) Preparación de las soluciones de Peroxisomina A₁ contaminadas



b) Control de Calidad

3.2.2 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A₃ e Iso-Peroxisomicina A₁ del fruto de *K. parvifolia*.

Al utilizar la técnica de Rivas²⁹ modificada obtuvimos lo siguiente:

- a) 34 mg de Iso-Peroxisomicina A₁
- b) 21 mg de Peroxisomicina A₃.

3.2.3 Aislamiento y purificación de la T516 de la raíz de *K. parvifolia*.

A partir del extracto de raíz proporcionado por Benavides³³ obtuvimos 1,20 mg de la T516.

3.3 Evaluación de la Pureza Fisicoquímica de la Peroxisomicina A₃, la Iso-Peroxisomicina A₁ y la T516.

3.3.1 Para la Peroxisomicina A₃.

- a. Pureza Espectroscópica. (Fig. 10)
- b. Espectro de RMN ¹H. (Fig. 11)
- c. Pureza Cromatográfica:

-CCF-FN:	Rf= 0,38	Fluorescencia= amarilla
-CCF-FR:	Rf= 0,35	Fluorescencia= amarilla-naranja
-CLAR-FR	t _R = 3,607 (Fig. 12)	

3.3.2 Para la Iso-Peroxisomicina A₁.

- a. Punto de Fusión= 273-274 °C
- b. Pureza Espectroscópica. (Fig.13)
- c. Pureza Cromatográfica: 0

-CCF-FN:	Rf= 0,23	Fluorescencia= naranja
-CCF-FR:	Rf= 0,29	Fluorescencia= negra
-CLAR-FR	t _R = 2,248 (Fig. 14)	

3.3.3 Para la T516.

- a. Pureza Espectroscópica. (Fig.15)
- b. Pureza Cromatográfica:

-CCF-FN:	Rf= 0.38	Fluorescencia=verde amarillento
-CLAR-FR-C8:	t _R = 2,965 (Fig. 16)	
-CLAR-FR-C18:	t _R = 5,085 (Fig. 24)	

3.4 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A₁ contaminadas y sin contaminar (control negativo).

Se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t de Student las dos muestras de Peroxisomicina A₁ contaminadas, las cuales no presentaron diferencia significativa. Posteriormente éstas se compararon con el control negativo^{34.35.36}.

3.4.1 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A₁ contaminadas con Peroxisomicina A₃.

Las contaminaciones realizadas fueron del 0,80, 1,25, 1,80, 2,50 y 5,00% p/p de Peroxisomicina A₃.

a. En la CCF-FN y la CCF-FR no se detectó la presencia de Peroxisomicina A₃ en ninguna de las concentraciones.

b. En la Espectroscopía UV-Vis, la Peroxisomicina A₁ y la Peroxisomicina A₃ poseen espectros idénticos (Fig. 17), y lógicamente al comparar las relaciones de Absorbancias de las muestras contaminadas y el control negativo no encontramos diferencia significativa (Gráfica 1).

c. Por CLAR-FR-C18, la Peroxisomicina A₃ presenta un t_R mayor que la Peroxisomicina A₁, y la señal es integrada a partir de una concentración del 1,80 % (Fig. 18).

d. Mediante el ensayo de Inhibición de la Catalasa no se detectó la presencia de la Peroxisomicina A₃ (Gráfica 2).

3.4.2 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A₁ contaminadas con la Iso-Peroxisomicina A₁.

Las contaminaciones realizadas fueron del 0,80, 1,25, 1,80, 2,50, 5,00, 7,50 y 10,00% p/p de Iso-Peroxisomicina A₁.

a. En la CCF-FN y la CCF-FR no se detectó la presencia de Iso-Peroxisomicina A₁ en ninguna de las concentraciones.

b. En la Espectroscopía UV-Vis, encontramos que al comparar las relaciones de Absorbancia de las soluciones contaminadas con Iso-Peroxisomicina A₁ y el control negativo no existía diferencia significativa. Procedimos entonces, a realizar la sobreposición de los espectros de Peroxisomicina A₁ e Iso-Peroxisomicina A₁ para buscar

longitudes de onda en las cuales hubiera diferencia en la absorción encontrando dos: 280 nm y 437 nm (Fig. 19). Utilizamos la relación 280nm/437nm para comparar las soluciones contaminadas y el control negativo, encontrando diferencia significativa a partir de una concentración del 1,25 % (Gráfica 3).

e. Por CLAR-FR-C18, la Iso-Peroxisomicina A_1 presenta un t_R menor que la Peroxisomicina A_1 , y la señal es integrada a partir de una concentración del 7,50% (Fig. 20). Es importante señalar que se realizó el análisis de pureza espectral para las soluciones contaminadas con concentraciones \leq que el 5,00% de Iso-Peroxisomicina A_1 , que se compararon con el control negativo; consideramos importante conocer este dato porque se ha comprobado que al ir envejeciendo la columna, cambia el t_R de la Iso-Peroxisomicina A_1 con respecto al de la Peroxisomicina A_1 (Fig. 21), en este caso sólo el análisis de pureza espectral evidenciaría su presencia. De esta forma se detectó la presencia de Iso-Peroxisomicina A_1 a partir de una concentración del 1,80% (Gráfica 4).

d. Mediante el ensayo de la Inhibición de la Catalasa, es evidente la presencia del contaminante a partir de una concentración del 1,80%, así mismo observamos que la presencia de Iso-Peroxisomicina A_1 aumenta el porcentaje de Inhibición de la enzima (Gráfica 5).

3.4.3 Análisis estadístico de las muestras de Peroxisomicina A_1 contaminadas con T516.

Las contaminaciones realizadas fueron del 0,50, 0,80, 1,25, 1,80, 2,50, 5,00 y 7,50% p/p de la T516.

a. En la CCF-FN y la CCF-FR no se detectó la presencia de la T516 en ninguna de las concentraciones.

b. En la Espectroscopía UV-Vis, la Peroxisomicina A_1 y la T516 presentan espectros muy diferentes (Fig. 22), y al comparar las relaciones de Absorbancias de las muestras contaminadas y el control negativo encontramos que se detecta a partir de una concentración del 5,00 % utilizando la razón de Absorbancias a 430nm/415nm y a partir de 0,80% utilizando las razones a 270nm/415nm y a 270nm/222nm (Gráfica 6).

c. Por CLAR-FR-C18, la T516 presenta el mismo t_R que la Peroxisomicina A_1 (Fig. 7) pero al utilizar CB como FE sí se separan (Fig. 23), observándose mayor sensibilidad al utilizar 310 nm como longitud de onda de detección (Fig. 24). Utilizando

las condiciones anteriores la T516 presenta un t_R mayor que la Peroxisomicina A₁, y es integrada a partir de una concentración del 2,50% (Fig. 25).

d. En el ensayo de la Inhibición de la Catalasa, encontramos evidente la presencia de la T516 a partir de una concentración del 2,50 %, además de ocasionar que la Inhibición de la enzima se incremente en forma proporcional al porcentaje de contaminación (Gráfica 7).

Los resultados de las Pruebas del Control de Calidad y sus Límites de Detección se resumen en la **Tabla 3**.

4. DISCUSION

En el presente trabajo se realizaron los experimentos necesarios para determinar los Límites de Detección para los tres contaminantes naturales por las pruebas empleadas en el Control de Calidad de la Peroxisomicina A_1 .

4.1 Establecimiento de los valores de la Pruebas del Control de Calidad para el Lote No. 75 de la Peroxisomicina A_1 .

El lote 75 de Peroxisomicina A_1 fue elegido para utilizarse durante el presente proyecto; dicho lote era el de mejor Calidad hasta la fecha de Diciembre de 1995. El lote fue sometido a todas las pruebas incluidas en el Control de Calidad, a excepción de la Citotoxicidad. Lo anterior se realizó con el fin de establecer los valores de partida de las pruebas Fisicoquímicas y Biológicas para usar en el resto del trabajo, y a la vez nos sirvieran como referencia.

Los resultados obtenidos en la pruebas Fisicoquímicas: medición del Punto de Fusión Inicial y Final, análisis por la CCF-FN, la CCF-FR, la CLAR-FR y la evaluación de la Pureza Espectroscópica, resultaron ser satisfactorios. Por otro lado, de las pruebas Biológicas, la única realizada fue la medición de la Inhibición de la Catalasa, obteniendo valores no ideales pero sí repetitivos; por esto se decidió trabajar con él durante el resto del proyecto.

4.2 La elección del fruto de *K. parvifolia* con mayor concentración de la Peroxisomicina A_3 , la Iso-Peroxisomicina A_1 y la T 516.

Se ha visto que la concentración de los compuestos de interés: la Peroxisomicina A_3 , la Iso-Peroxisomicina A_1 y la T516, en los frutos de *K. parvifolia* es mínima, por lo que con el objetivo de encontrar el fruto que contuviese una concentración mayor de estos contaminantes y facilitar el proceso de extracción, se realizó el ensayo que se muestra en el Diagrama 1.

Los frutos de *K. parvifolia* de distintos municipios de los estados de Sinaloa y Sonora fueron sometidos a la estrategia anterior, para obtener el extracto y posteriormente analizarlo por CLAR-FR. Del experimento anterior obtuvimos que la mejores fuentes de obtención para la Peroxisomicina A_3 fueron el fruto del municipio de Bajosori y para la Iso-Peroxisomicina A_1 , Loretillo. Dichos frutos de *K. parvifolia* se juntaron para el proceso posterior; esto debido a que el proceso de purificación para ambos compuestos sigue la misma estrategia y el hacerlo en conjunto implicaba un ahorro en el consumo de los solventes, las fases y el tiempo dedicado a ello (Diagrama 2).

4.3 Aislamiento y purificación de Peroxisomicina A₃ e Iso-Peroxisomicina A₁.

Según lo expresado en el párrafo anterior para obtener la Peroxisomicina A₃ y Iso-Peroxisomicina A₁ se utilizó el fruto de *K. parvifolia* recolectado en Bajosori y Loretillo. Este fruto se sujetó a la estrategia presentada en el Diagrama 2. La extracciones con EP y AcOEt se realizaron por percolación utilizando una columna, ya que se ha demostrado que esta técnica proporciona rendimientos semejantes a la agitación y posterior filtración.

Esto permite ahorrar esfuerzos, tiempo y evitar accidentes de laboratorio en la manipulación del material. La extracción con MeOH fue realizada con el propósito de eliminar la mayor parte de la T496 debido a que ésta es insoluble en dicho solvente³⁷. Así el extracto metanólico está enriquecido con Peroxisomicina A₁, Peroxisomicina A₂, Peroxisomicina A₃ e Iso-Peroxisomicina A₁. Posteriormente se realizaron con este extracto varias CC Flash, eliminado de éste la Peroxisomicina A₂ y obteniendo el Ppt 2 que contiene Peroxisomicina A₁, Peroxisomicina A₃ e Iso-Peroxisomicina A₁.

El Ppt 2 se sujetó a una CC Gravitacional, con la que logramos aislar la Peroxisomicina A₁ y la Iso-Peroxisomicina A₁ (34 mg) nuestro primer compuesto de interés, así como una fracción que contiene la mezcla de Peroxisomicina A₃ e Iso-Peroxisomicina A₁. Esta fracción fue sometida a una CLAR-FR preparativa aislando la Peroxisomicina A₃ (21mg). La utilización de la CLAR-FR preparativa sólo en esta última etapa, fue por el hecho de ahorrar el consumo de fases y solventes grado cromatográfico.

4.4 Aislamiento y purificación de la T516.

La T516 presenta por CLAR-FR el mismo t_R que la Peroxisomicina A₁ obtenidas de los extractos de frutos de *K. parvifolia* lo que dificulta su separación y purificación. Por lo anterior, optamos trabajar con extractos de raíz de *K. parvifolia*, pues en esta fuente es conocido que la Peroxisomicina A₁ está ausente^{31,33}.

Así, para la obtención de la T516 a partir de la raíz, se siguió la estrategia planteada en el Diagrama 3, consistente en extracciones sucesivas y precipitación. El Ppt obtenido se sujetó a una CC Flash, para obtener la mezcla de la T516 y la T544.

Esta mezcla se sometió a una CC de Baja Presión obteniendo la T516 pura (1,20 mg), nuestro tercer contaminante de interés.

4.5 Evaluación de la Pureza Fisicoquímica de Peroxisomicina A₃, Iso-Peroxisomicina A₁ y T516

4.5.1 La Pureza Fisicoquímica de Peroxisomicina A₃.

Para la evaluación de la pureza de Peroxisomicina A₃ se analizaron los máximos de Absorción UV-Vis, las señales características en el espectro de de RMN ¹H, los valores de R_f y el color de la fluorescencia en la CCF-FN y la CCF-FR, así también el t_R en la CLAR-FR-C18, siendo todos los resultados obtenidos coincidentes con los reportados en la literatura²⁹.

4.5.2 Pureza Fisicoquímica de Iso-Peroxisomicina A₁.

En el caso de la evaluación de la pureza de Iso-Peroxisomicina A₁ obtuvimos también resultados equiparable con los reportados en la literatura (el Punto de Fusión, los máximos de Absorción UV-Vis, los valores de R_f y el color de la fluorescencia en la CCF-FN y la CCF-FR). Solamente en el caso de la CLAR-FR encontramos que el t_R de Iso-Peroxisomicina A₁ fue menor que el reportado para la Peroxisomicina A₁ al utilizar las mismas condiciones de trabajo²⁹. Esto es originado porque la columna C18 que utilizamos durante esta investigación es nueva y se ha observado que al envejecer ésta, el t_R de Iso-Peroxisomicina A₁ cambia con respecto al de Peroxisomicina A₁, de tal manera que con el tiempo se presenta un fenómeno (aún no aclarado) como el se representa en la Fig. 21. Lo anterior origina que el t_R del isómero en estas condiciones no sea un criterio muy constante de pureza, de aquí la importancia de utilizar el Detector de Arreglo de Fotodiodos como criterio de pureza (Fig. 9).

4.5.3 Pureza Fisicoquímica de la T516.

En la evaluación de la pureza de la T516 obtuvimos resultados que coinciden con los reportados en la literatura: los máximos de Absorción UV-Vis, los valores de R_f y el color de la fluorescencia en la CCF-FN, así también el t_R en la CLAR-FR-C18 y la CLAR-FR-C8^{29,33}.

4.6 Evaluación estadística de las muestras de Peroxisomicina A_1 contaminadas y no contaminadas. Establecimiento de los Límites de Detección para cada contaminante natural por las Pruebas del Control de Calidad de la Peroxisomicina A_1 .

Para realizar lo anteriormente expuesto se prepararon dos soluciones de Peroxisomicina A_1 contaminadas a distintas concentraciones utilizando las distintas sustancias de interés (*la Peroxisomicina A_3 , la Iso-Peroxisomicina A_1 y la T516*); realizamos todas las pruebas del Control de Calidad por triplicado para cada una de estas soluciones contaminadas, así también para una solución de Peroxisomicina A_1 sin contaminar: *control negativo*. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente no encontrando diferencia significativa entre las soluciones contaminadas. Posteriormente se compararon los resultados contra el control negativo, logrando establecer los Límites de Detección para cada contaminante por cada prueba.

4.6.1 Análisis estadístico de las soluciones de Peroxisomicina A_1 contaminadas con Peroxisomicina A_3 . Los Límites de Detección para la Peroxisomicina A_3 .

Al utilizar las CCF-FN y CCF-FR no fue detectada la presencia de Peroxisomicina A_3 , comprobando que estas técnicas analíticas son poco sensibles en nuestro caso, aún más si es el ojo humano el detector.

Por otro lado, al utilizar la relaciones de Absorbancias a las longitudes de onda previamente establecidas, tampoco fue detectada la presencia de este contaminante, ya que la Peroxisomicina A_1 y la Peroxisomicina A_3 son diastereoisómeros, y presentan espectros UV-Vis idénticos (Fig.17). Por otro lado, al utilizar la CLAR-FR-C18, se pudo detectar la presencia de la Peroxisomicina A_3 a partir de una concentración del 1,80%, lo cual la convierte en prácticamente la única prueba de las actualmente en uso que permite detectar la presencia de esta sustancia.

En cuanto a la prueba de la Inhibición de la Catalasa, encontramos que no es detectada la presencia de la Peroxisomicina A_3 en el rango de contaminaciones trabajadas. Cabe señalar que el porcentaje de Inhibición reportado para la Peroxisomicina A_1 es del 43% y para la Peroxisomicina A_3 del 37.04%, por lo que es comprensible que un pequeño % de contaminación de esta última no afecta significativamente los resultados²³.

4.6.2 Análisis estadístico de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con Iso-Peroxisomicina A₁. Los Límites de Detección para la Iso-Peroxisomicina A₁.

De las pruebas Físicoquímicas empleadas, de nueva cuenta ni el uso de la CCF-FN ni la CCF-FR permitió detectar la presencia de Iso-Peroxisomicina A₁ por las mismas razones expuestas con anterioridad. En el caso de utilizar las relaciones de Absorbancias a las longitudes de onda fijadas previamente, encontramos que no fue posible detectar la presencia de esta impureza. Posteriormente utilizamos la relación de Absorbancias a 480 nm/237nm, logrando detectar la Iso-Peroxisomicina A₁ a partir del 1,25 %, lo que la convierte en una prueba más sensible para detectar este contaminante.

Por la CLAR-FR-C18 se detectó a partir del 1,80%, observándose un pequeño hombro o desviación de la simetría del pico a concentraciones menores del 7,50%. Al utilizar el análisis de pureza espectral del pico, encontramos que esta impureza es detectada a partir del 1,80% (Fig. 21); evidentemente esta herramienta nos proporciona una mayor sensibilidad de la técnica de la CLAR-FR. Es necesario considerar que el análisis espectral en este caso es de suma importancia por lo expresado anteriormente de que el t_R de la Iso-Peroxisomicina A₁ cambia al envejecer la columna.

En la Prueba Biológica de la Inhibición de la Catalasa, la presencia de la Iso-Peroxisomicina A₁ fue detectada a partir de una concentración del 1,80% presentando un aumento de la inhibición proporcional al porcentaje de contaminación. Es necesario aclarar que el porcentaje de Inhibición reportado para la Peroxisomicina A₁ es menor que para la Iso-Peroxisomicina A₁, lo que nos sugiere pensar en una potenciación del efecto inhibitorio de la solución mezcla para la Catalasa, por lo que sería conveniente estudiar más a fondo las propiedades de la Iso-Peroxisomicina A₁ (K_m , $V_{máx}$)²³.

4.6.3 Análisis estadístico de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con T516. Los Límites de Detección para la T516.

De igual manera que en los casos anteriores el utilizar las CCF-FN y CCF-FR no fueron suficientemente sensibles para detectar las contaminaciones con las concentraciones trabajadas de T516. Al utilizar las relaciones de Absorbancia a las longitudes de onda previamente establecidas, logramos su detección; esto debido a que estas dos sustancias poseen un espectro de absorción UV-Vis realmente muy diferente.

De las relaciones de Absorbancia utilizadas fueron las de 270nm/415nm y 270nm/222nm las más sensibles (la detectan a partir del 0,80%) debido a que la diferencia mayor en sus espectros de absorción está precisamente entre los 215nm y los 300 nm (Fig. 22).

Está reportado en la literatura^{29,31,33} que la T516 presenta por CLAR-FR-C18 el mismo t_R que la Peroxisomicina A_1 , así también que utilizando la CLAR-FR-C8 se pueden resolver perfectamente ambas sustancias. Por lo anterior al utilizar la CLAR-FR-C8 a la longitud de onda a 300 nm, resultó ser más sensible para detectar la T516 y logramos evidenciar la impureza a partir del 2,50% de contaminación.

Por último, al utilizar el ensayo de la Inhibición de Catalasa, pudimos detectar la T516 a partir de una concentración del 2,50% y al igual que en las soluciones contaminadas con la Iso-Peroxisomicina A_1 existe un incremento en la inhibición de esta enzima proporcional a la concentración de la impureza. De la misma manera que en el caso anterior es necesario la caracterización de los valores de K_m y $V_{máx}$ de la T516²³.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo estamos en condiciones de diseñar un tipo de etiqueta para identificar a los lotes de Peroxisomicina A_1 , que especifique la concentración de cada uno de los contaminantes naturales: la Peroxisomicina A_3 , la Iso-Peroxisomicina A_1 y la T516 (Tabla 4).

5. CONCLUSIONES

1.- En las soluciones contaminadas con la **Peroxisomicina A₃** encontramos que, de las pruebas incluídas en nuestro Control de Calidad, sólo es detectada por **CLAR-FR-C18** y es a partir de una concentración del **1,80%**.

2.- En el caso de la **Iso-Peroxisomicina A₁** se puede detectar por medio de la **Espectroscopía UV-Vis** utilizando la relación de Absorbancias a **280 nm/437 nm**, a partir de una concentración del **1,25 %**; por medio del **CLAR-FR-C18** y el ensayo de la **Inhibición de la Catalasa** se puede detectar a partir de una concentración del **1,80 %**.

3.- Así mismo la **T516**, es detectada por la **Espectroscopía UV-Vis** utilizando la relación de Absorbancias a **430 nm/415 nm** a partir de una concentración del **5,00 %** y relacionando las Absorbancias a **270 nm/415 nm** o **270 nm/222 nm** es detectada a partir de una concentración del **0,80 %**; la **CLAR-FR-C8** y el ensayo de la **Inhibición de la Catalasa** permitieron detectarla a partir de una concentración del **2,50 %**.

4.- Por lo tanto de las pruebas incluídas en nuestro **Control de Calidad**, la más sensible para la **Peroxisomicina A₃** fue la **CLAR-FR-C18**; mientras que para la **Iso-Peroxisomicina A₁** y la **T516**, fue la **Espectroscopía UV-Vis**.

RECOMENDACIONES

1.- Las soluciones de la Peroxisomicina A_1 contaminadas con la Iso-Peroxisomicina A_1 o la T516, mostraron un aumento la Inhibición de la Catalasa respecto de la solución de la Peroxisomicina A_1 sin contaminar; teniendo en cuenta que el grado de Inhibición de esta enzima producido por la Iso-Peroxisomicina A_1 y la T516 puras es menor que el reportado para la Peroxisomicina A_1 , los resultados por nosotros obtenidos sugieren un posible potenciación de la Inhibición, lo cual debería ser estudiado con pruebas cinéticas más específicas²³.

2.- En la batería de pruebas que incluye el Control de Calidad de la Peroxisomicina A_1 , la más sensible resultó ser la Espectroscopía UV-Vis de orden cero, por lo que se sugiere utilizar la Espectroscopía de Derivadas y/o Calibración Bivariante, con el objetivo de encontrar una disminución en el Límite de Detección recién establecido^{38,39,40}.

REFERENCIAS

1. Evans, W. C. "Farmacognosia". McGraw Hill Interamericana. México. pp. 1-3, 135-158, 692-718. (1991).
2. Abreu, L.M. "Introducción a la Medicina Interna". Ed. Méndez Cervantes. pp. 7.3, 7.15. México. (1991)
3. Colegate, S.M., Russell, J. M. "Bioactive Natural Products". CRC Press. London. pp. 9, 159, 195, 221. (1995).
4. Harborne, J.B. Phytochemical Methods "A guide to modern techniques of plants analysis". Science Paperbacks. London. pp. 4, 7, 14, 26, 34. (1973).
5. Domínguez X. A. Phytochemistry methods frontiers. "Special Supplement Rev. Latinamer. Quím". pp. 37, 227. (1990).
6. Clark W., Brater D., Johnson A. "Farmacología Médica de Goth". 13a.Ed. Ed. Mosby. México. pp. 704. (1993).
7. Fernández, R. "Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* en México". Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México. Ser. Bot. 63 (1) pp. 1-23. (1992).
8. Clavijero, F.J. "Historia de la Antigua Baja California, México". 3a. Ed. Ed. Porrúa, S. A. pp. 31-32 (1982).
9. (a) Shaver, T. N., Ph. D. Thesis. Texas A and M University. (1966). (b) Kim, H. L., Ph. D. Thesis. Texas A and M University. (1970). (c) Kim, H. L and Camp, B. J. *Toxicon*. 10:83 (1972).
10. Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". *J. Am. Chem. Soc.* 97. pp 4985. (1975).
11. Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. "Extraction and Quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora)". *Toxicon* 25. p. 565. (1987).
12. Bermúdez, M.V., Martínez, F., Waksman, N. and Piñeyro, A. "Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea pig, hamster and dog". *Toxicon*. 30. p. 1493. (1992).

13. Bermúdez, M.V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. "Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)". *Toxicon*. 24. p. 1091. (1986).
14. Piñeyro-López, A. "Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T514 de la *Karwinskia humboldtiana*". Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UANL. Monterrey México. (1990).
15. Piñeyro, A., Martínez de Villarreal, L. and González, R. "In vitro selective toxicity of toxin T514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines". *Toxicology*. 92. pp. 217-227. (1994).
16. Piñeyro-López, A., "Pharmazeutisch brauchbare Naphthalin und Anthracenderivate" "pharmaceutically applicable naphthalene and anthracene derivatives" "Derivés de naphthaline et d'anthracene utiles comme medicamenta" *Europäisches Patenblatt*, 48/1995, 29.11.1995.
17. Waksman, N., Martínez, L. y Fernández, R. "Screening chemical and toxicological in genus *Karwinskia* (México)". *Rev. Latinoam. Quím.* 20. p. 27. (1989).
18. Waksman, N., Santoyo, A., Ramírez, R., Fernández-Nava, R. y Piñeyro-López, A. "Cuantificación de T514 (Peroxisomicina A₁) en plantas del género *Karwinskia*". *Polibotánica*, en prensa.
19. Waksman, N. and Ramírez, R. "Isolation of new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*". *Rev. Latinoam. Quím.* 23/1 and 22/4. pp 25-2. (1992).
20. Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N. "Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species". *Planta Médica*. 56. p. 562 (1990).
21. Garza, L., Hisch, G., Acosta, D., Torres, O., and Piñeyro, A. "Toxicity assesment of toxins T514 y T544 of buckthorn (*K. humboldtiana*) in primary skin and liver cells cultures". *Toxicology*. 73. pp. 191-201. (1992).
22. Sepúlveda, J., Van Der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro, A., Harder, W. y Veenhuis, M. FEMS. "Studies on the effects of toxin T514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts". *Microbiology Letters*. pp. 207-212. (1992).
23. Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N. and Piñeyro, A. "Effect of Peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity". *Planta Médica*. 61.(4). pp. 337-340. (1995).

24. Quatrocci, O., Abelaira de Andrizzi, S., Laba, R.F. "Introducción a la HPLC". Merck, pp. 304-312. (1992).
25. García de Marina, A., Castillo B. del, G. "Cromatografía Líquida de Alta Resolución". LIMUSA. pp. 195-198. (1989).
26. Aebi, H. in Methoden der Enzymatischen Analysen. p. 479. (1974).
27. Ekwall, B. y Johnson, A. Toxicology Letters. 5.p. 199. (1980).
28. Waksman de Torres N., Torres M.R, Salazar, M. L., Martínez de Villarreal L., y Piñeyro, L., A. "Control de Calidad de un producto natural de interés farmacológico". Rev. Soc. Quím. Méx. 38. 5. p. 255.(1994).
29. Rivas-Galindo, V. M. "Estudio químico de los extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* y *K. jonthstonii*". Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, México.(1995).
30. Gill, M., Steglich, W. "Progress in Chemistry organic. Natural Products. 51.150. (1987).
31. Salazar, M. L., Piñeyro, A., Waksman, N. "A Reverse Phase HPLC Method for Quantification of Peroxisomicine and other Anthracenonic compounds". J. Liq. Chrom. and Rel. Technol. 19 (9), 1391-1403, (1996).
32. Skoog, D. A., West, D.M., Haller, J. F. "Química Analítica". McGraw-Hill. 1a. Ed. México. pp. 458-459 (1995).
33. Benavides-Cortez, G. A. "Estudio químico biodirigido de la raíz de *K.parvifolia*". Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, México. (1996).
34. Daniel, W. "Bioestadística (Base para el análisis de las ciencias de la salud)". LIMUSA. 3a.Ed, México. pp. 188-196, 263-266. (1989).
35. Spiegel, M. R. "Teoría y Problemas de Bioestadística". McGraw-Hill. México. pp. 188-198. (1989).
36. Norman, G.R., Streiner, D.L. "Bioestadística". Times Mirror International Publisher. Barcelona, España. pp.176-180. (1996).
37. Martínez-Villarreal, L. E. "Estudio de las propiedades fisicoquímicas de las toxinas aisladas de *Karwinskia humboldtiana*". Tesis de Maestría. Facultad de Medicina.UANL. Monterrey, México. (1990).

38. López-de-Alba, P. L., López-Martínez, L. "Una introducción a la Espectrometría de Derivadas". *Revista de Educación Química*. México. pp. 160-170. (1995).
39. López-de-Alba, P. L., López-Martínez, L., Wrobel-Kaczmarczyk, K., Wrobel-Zasada, K., and Amador-Hernández, J. "The resolution of dye binary mixtures by divariate calibration using spectrophotometry data". *Analytical Letters*, 29 (3), 487-503 (1996).
40. López-de-Alba, P.L., López-Martínez, L. y L.M. de-León-Rodríguez "Determinación simultánea de los colorantes amarillo-5 y amarillo-6 por espectrofotometría de espectros cocientes derivados y por medida de áreas de sus respectivos cocientes". *Bol. Soc. Chi. Quím.*, 40, 393-401 (1995).

APENDICE A

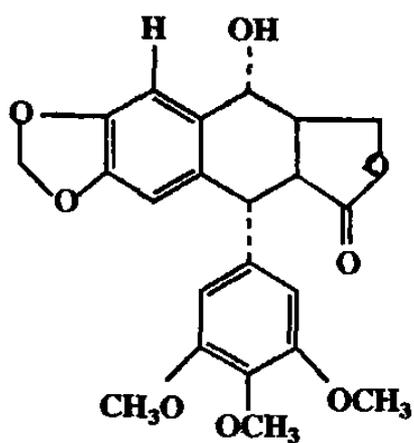


Fig. 1. Estructura química de la Podofilotoxina aislada de *Podophyllum hexandrum* y *P. peltatum*.

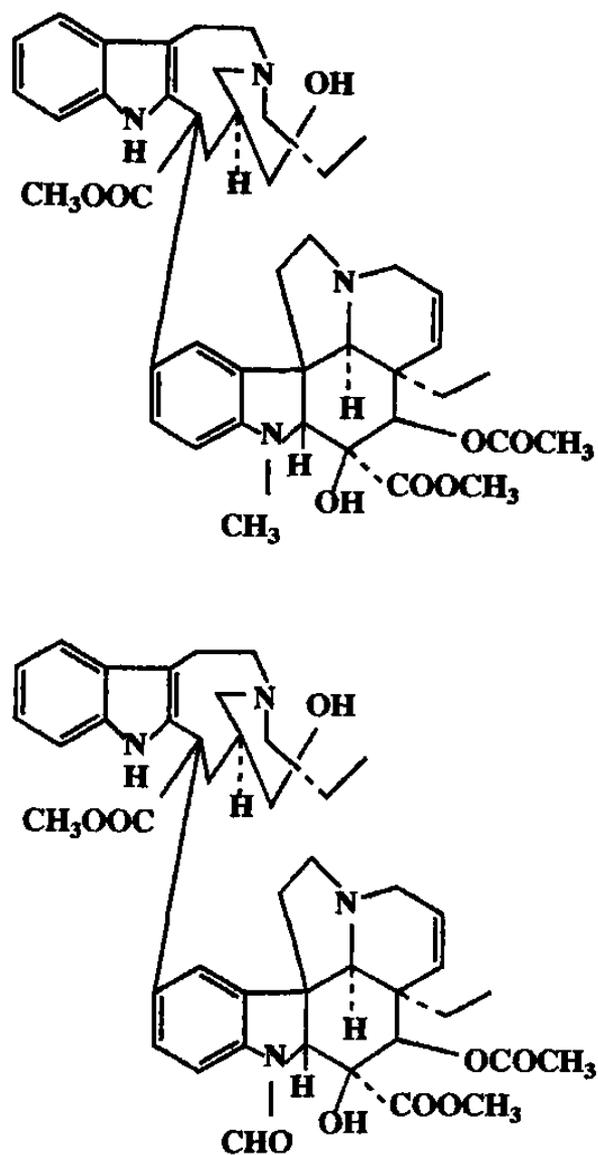


Fig. 2. Estructuras químicas de la Vinblastina y Vincristina aisladas del *Cantharantus roseus*.

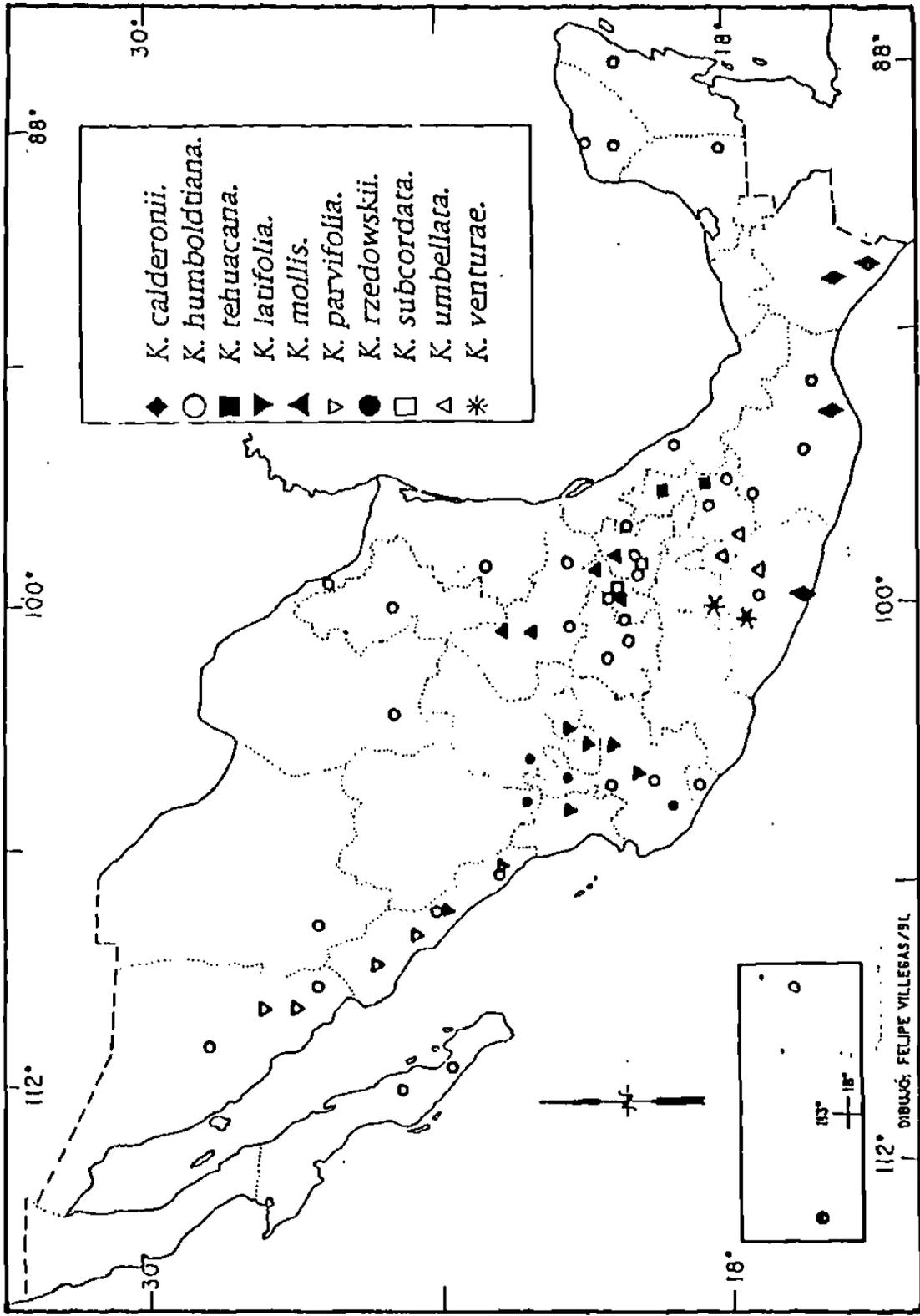
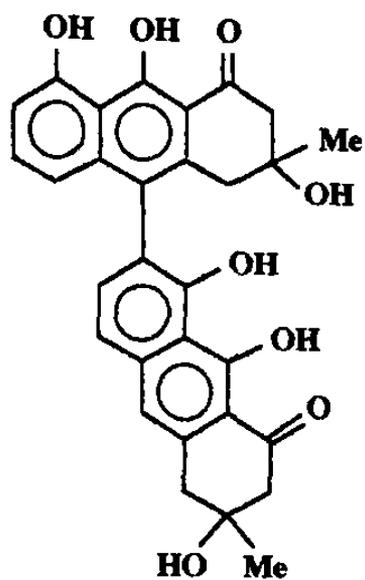
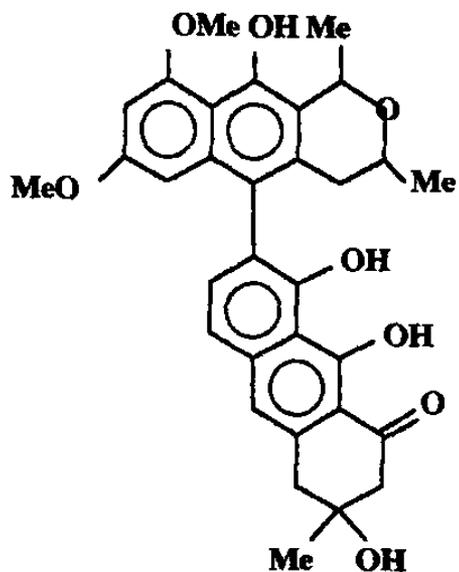


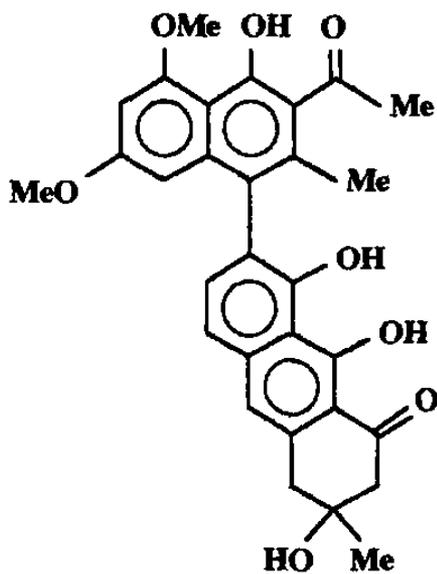
Fig. 3. Distribución geográfica de las especies del género de *Karwinskia* en México.



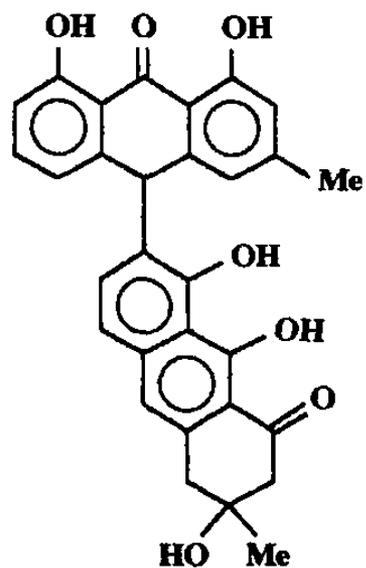
T 514



T 544



T 516



T 496

Fig. 4. Compuestos antracénicos aislados de *Karwinskia humboldtiana* por Dreyer y cols., en 1975.

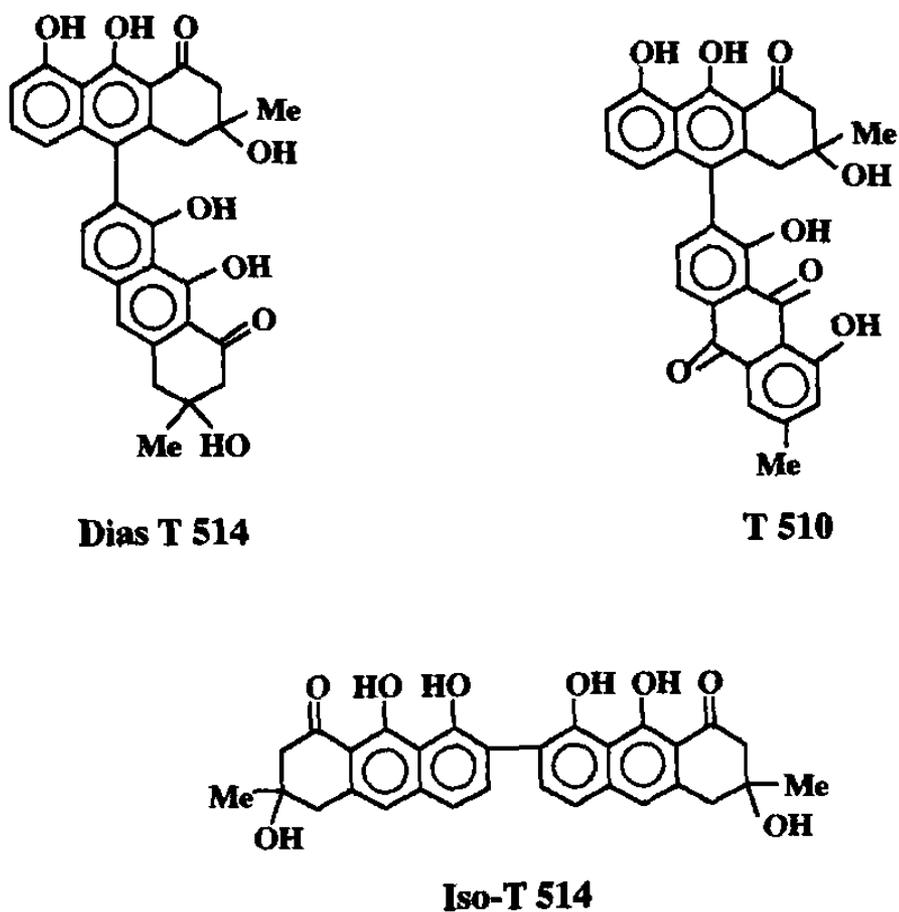


Fig. 5. Diastereoisómero e Isómero posicional de la T 514 aislados de las *Karwinskia parvifolia*, *K. tehuacana* y *K. umbellata* por Waksman y cols., en 1990 y 1992.

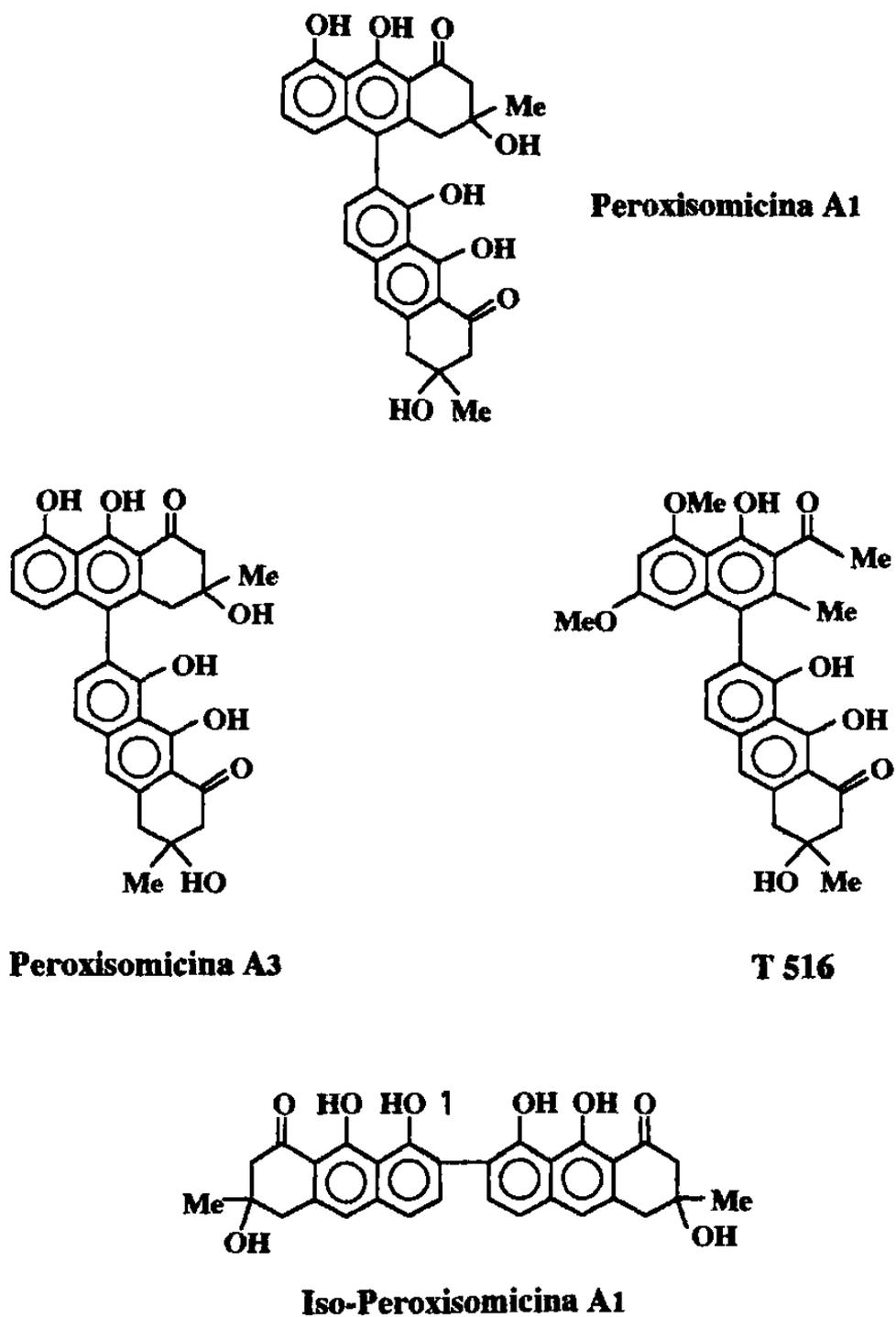


Fig. 6. Isómeros de la Peroxisomicina A1 aislados de *K. parvifolia* por Rivas, en 1995.

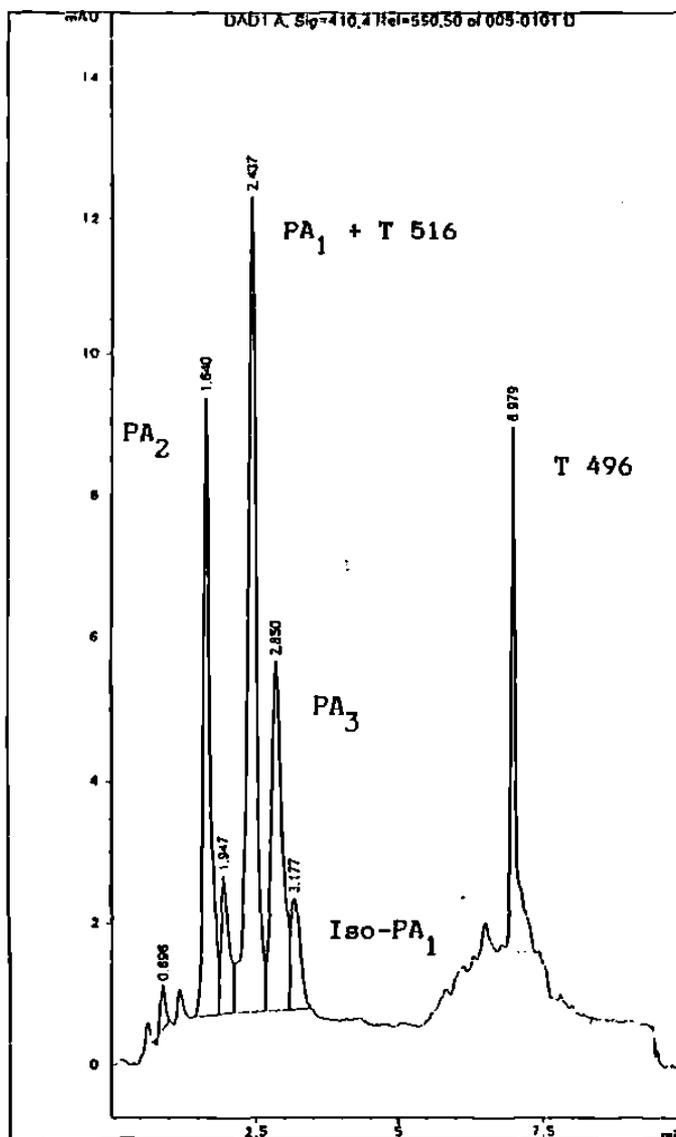


Fig. 7. Cromatograma que muestra los compuestos minoritarios presentes durante el proceso de purificación de la Peroxisomicina A1.

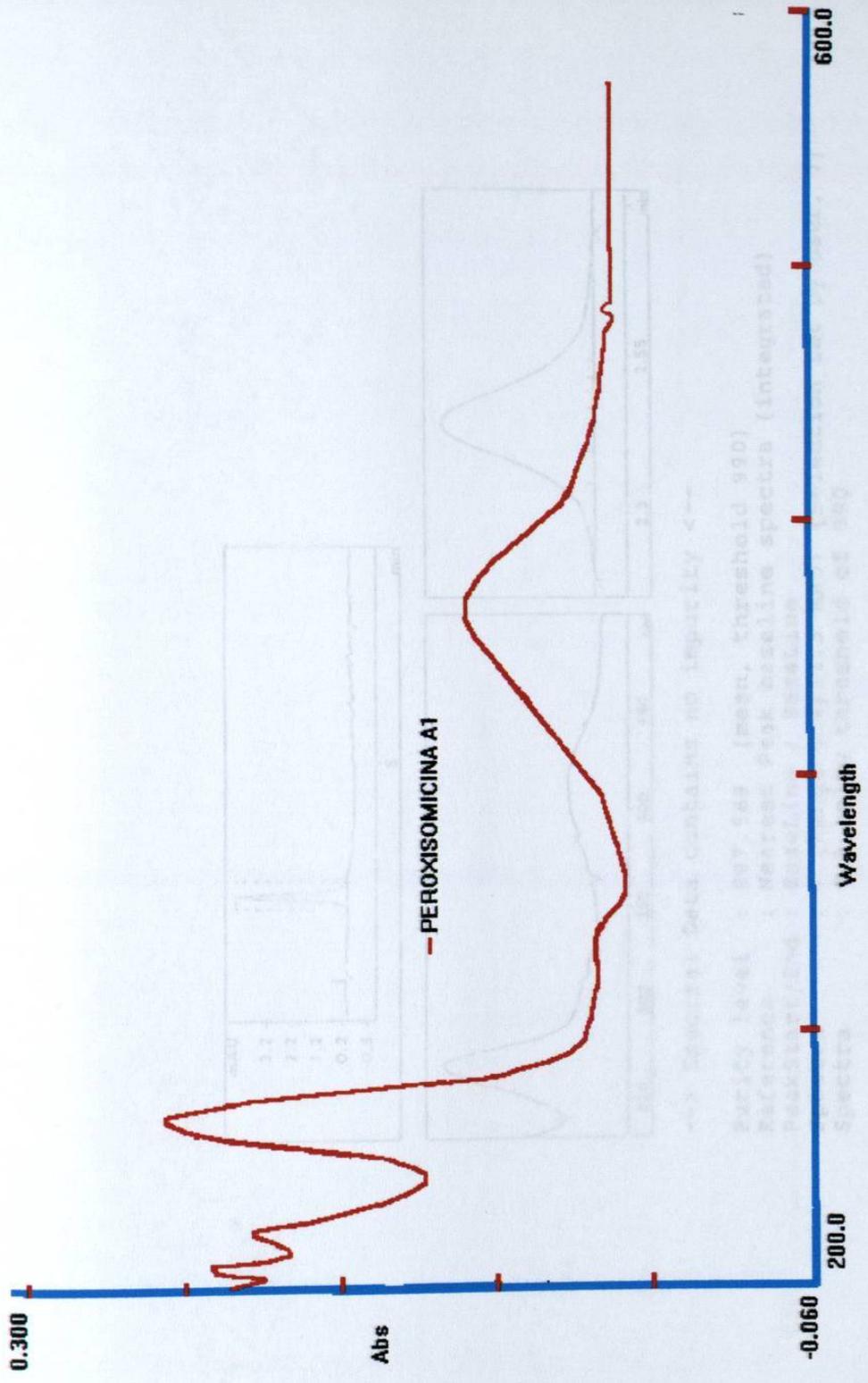
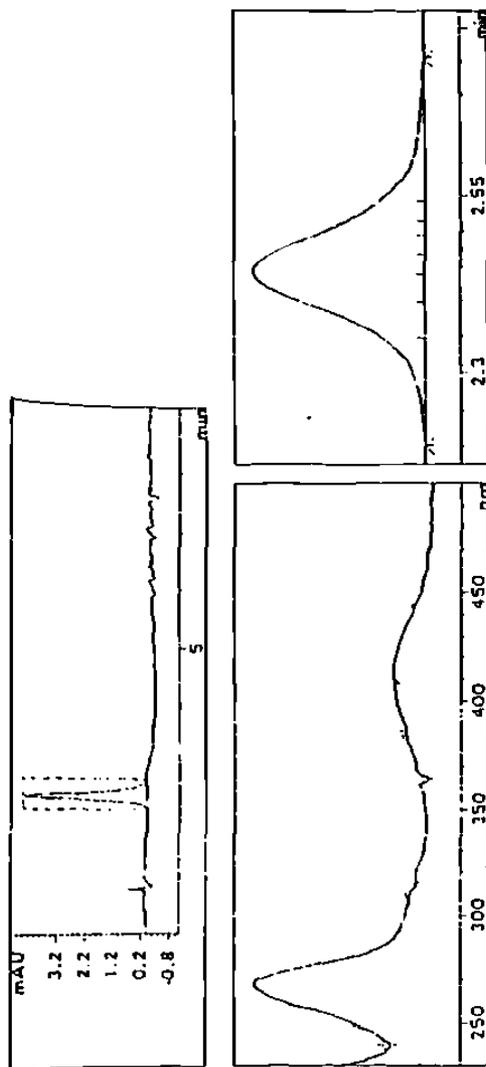


Fig. 8. Espectro UV-Vis de la Peroxisomicina A1.

Fig. 9. Cromatograma de la Peroxisomicina A1.



--> Spectral Data contains no impurity <--

Purity level : 997.569 (mean, threshold 990)
 Reference : Nearest Peak baseline spectra (integrated)
 PeakStart/End : BaseLine / BaseLine
 Spectra : 7 (Range 5.4/21.3 mAU) (Selection set by user, 7)
 Spectra : 0 & below threshold of 990

Fig. 9. Cromatograma de la Peroxisomicina A1.

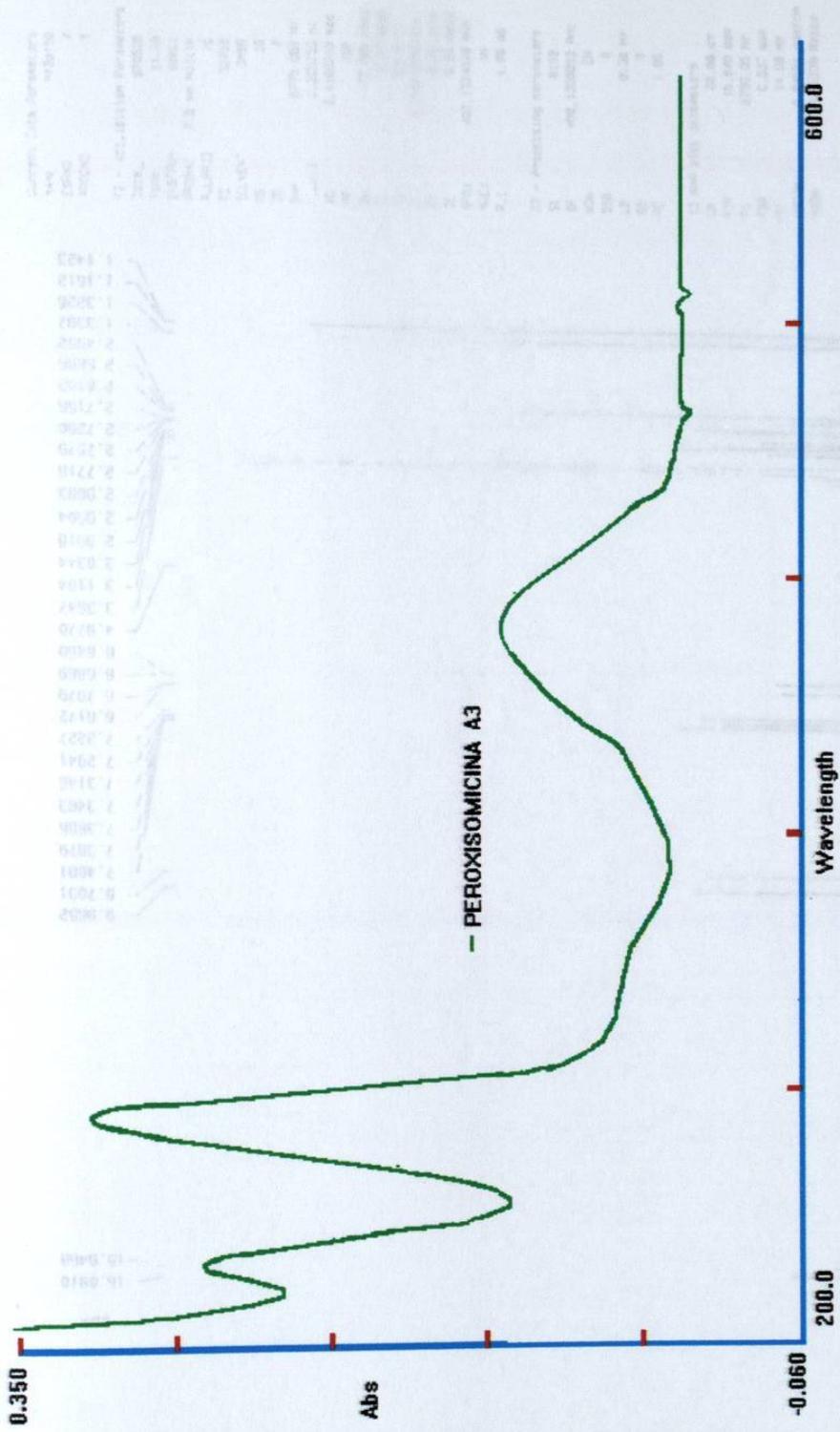


Fig. 10. Espectro UV-Vis de la Peroxisomicina A3.

Fig. 11. Espectro RbN 4H de la Peroxisomicina A3.

Espectro RMN 1H
peroxisomicina A3

```

Current Data Parameters
NAME          16.0910
EXPNO         4
PROCNO        1
-----
F2 - Acquisition Parameters
Date_         970529
Time          11.40
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm MUX-1H
PULPROG       zgpg30
PC            32768
SOLVENT       DMSO
NS            18
DS            2
SWH            6775.088 Hz
FIDRES        0.222745 Hz
AQ            2.418283 sec
RG            362
AQ            72.800 usec
SFO            400.1334078 MHz
NUC1           1H
P1            1.00 usec
-----
F2 - Processing parameters
SI            6552
SF            400.1330953 MHz
WDW            EM
SSB            0
GB            0
PC            0.38 usec
EC            0
SC            1.00
-----
13 NUC 3101 parameters
CX            20.00 usec
CP            18.970 usec
PC            6790.05 MHz
PR            C.33 usec
PZ            14.58 MHz
SFO            0.84851 usec/cm
WDW            308.75339 usec/cm

```

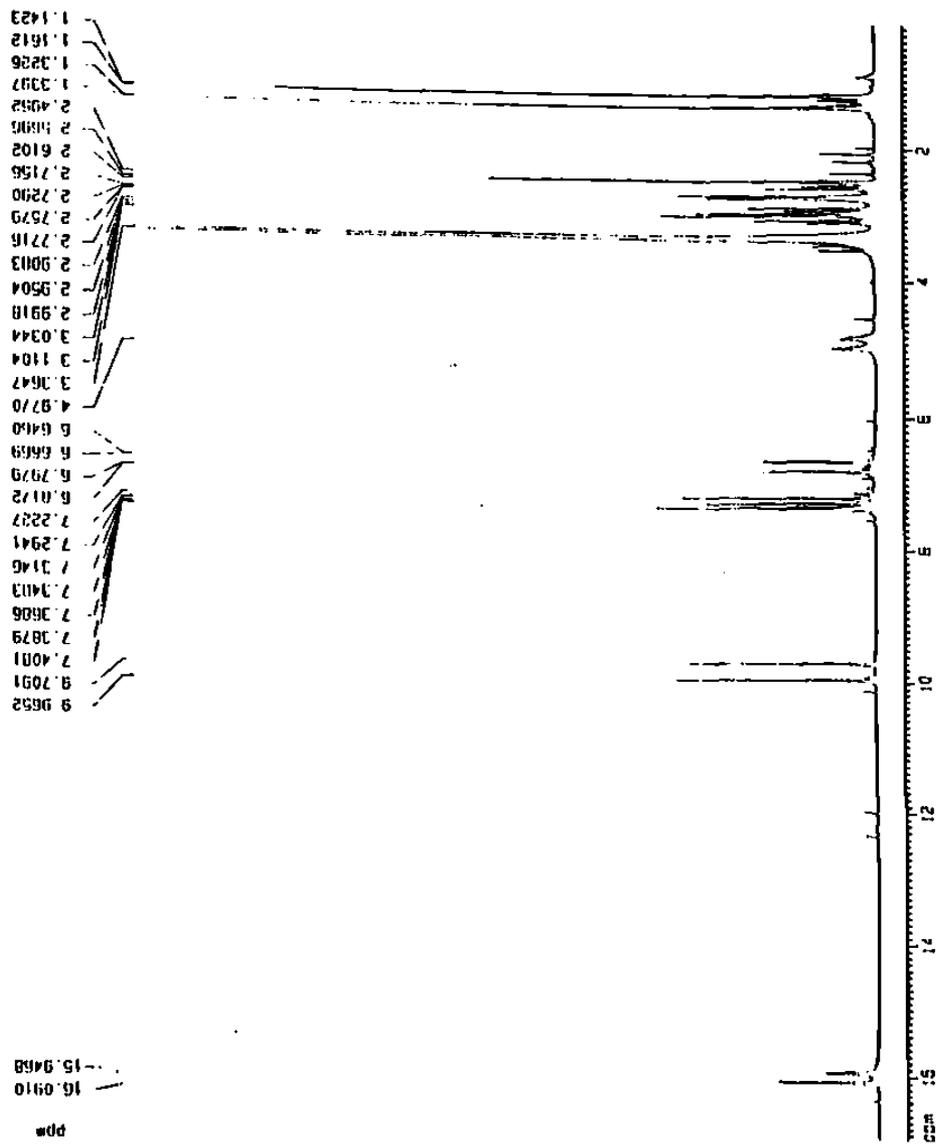


Fig. 11. Espectro RMN 1H de la Peroxisomicina A3.

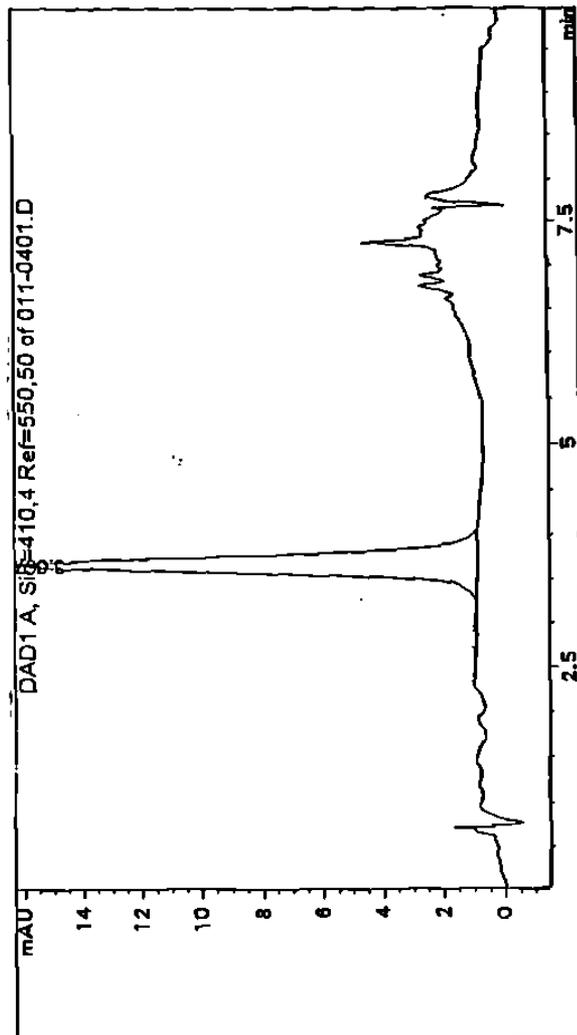


Fig. 12. Cromatograma de la Peroxisomicina A3.

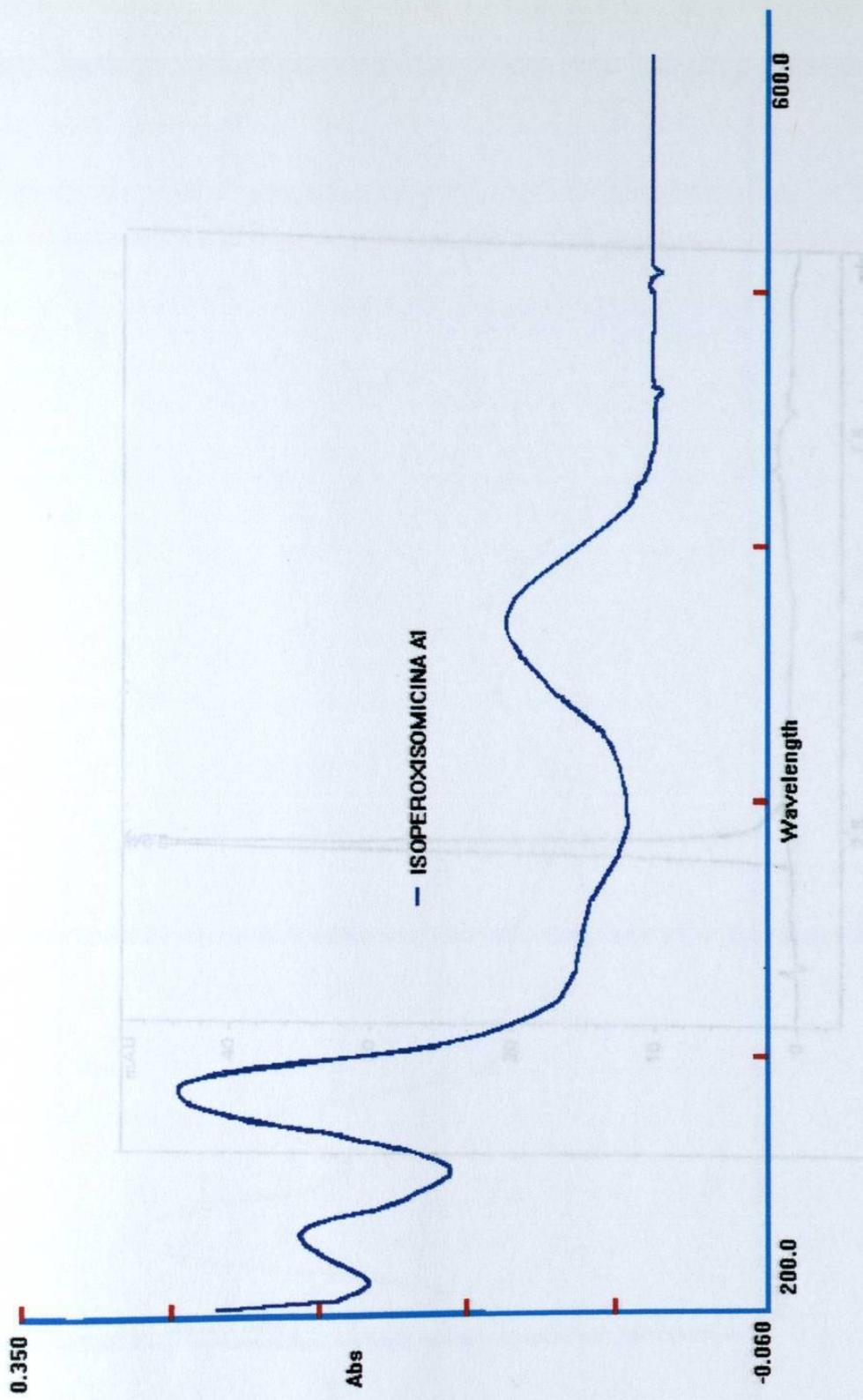


Fig. 13. Espectro UV-Vis de la Iso-Peroxisomicina A1.

Fig. 14. Cromatograma de la Iso-Peroxisomicina A1.

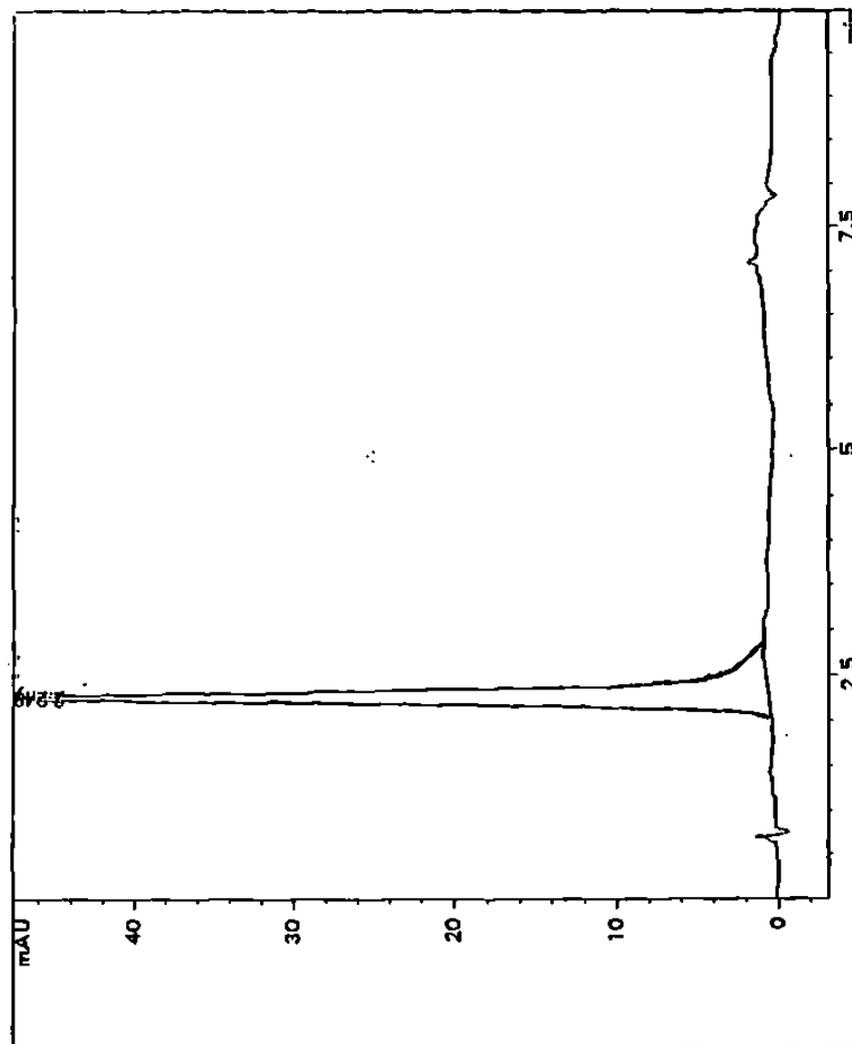


Fig. 14. Cromatograma de la Iso-Peroxisomicina A1.

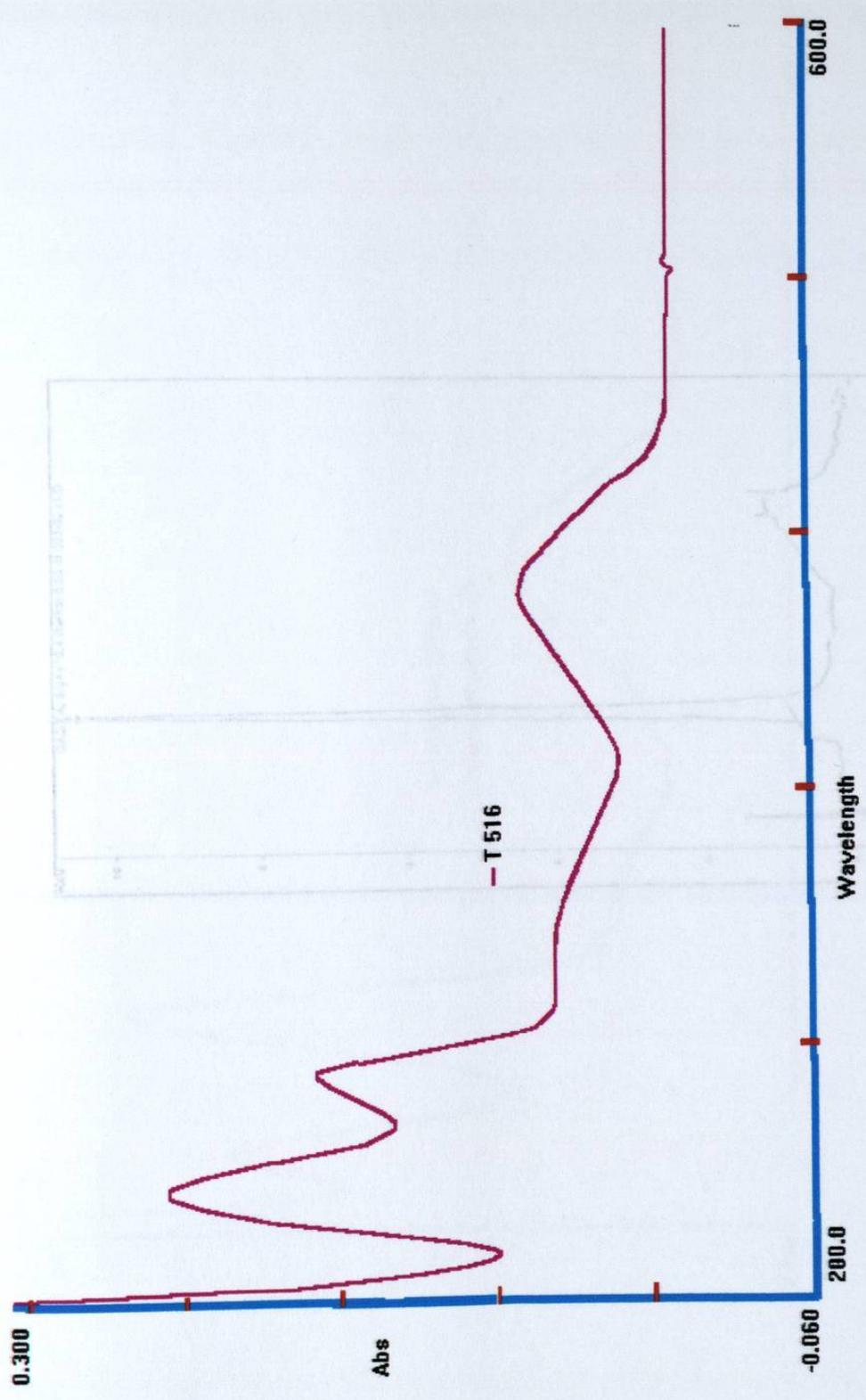


Fig. 15. Espectro UV-Vis de la T516.

Fig. 16. Cromatograma de la T516.

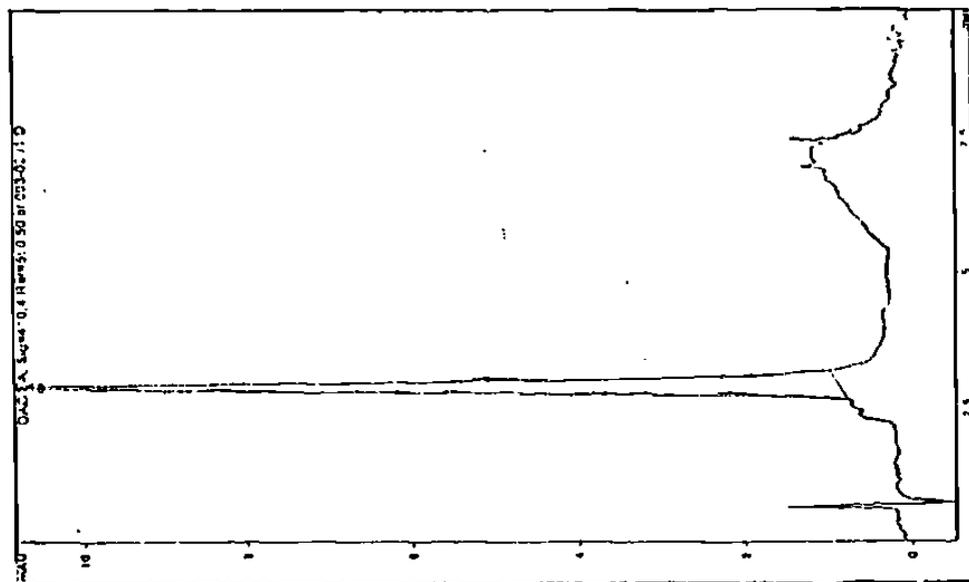


Fig. 16. Cromatograma de la T516.



Fig. 17. Espectros UV-Vis de la Peroxisomicina A1 y la Peroxisomicina A3 sobrepuestos.

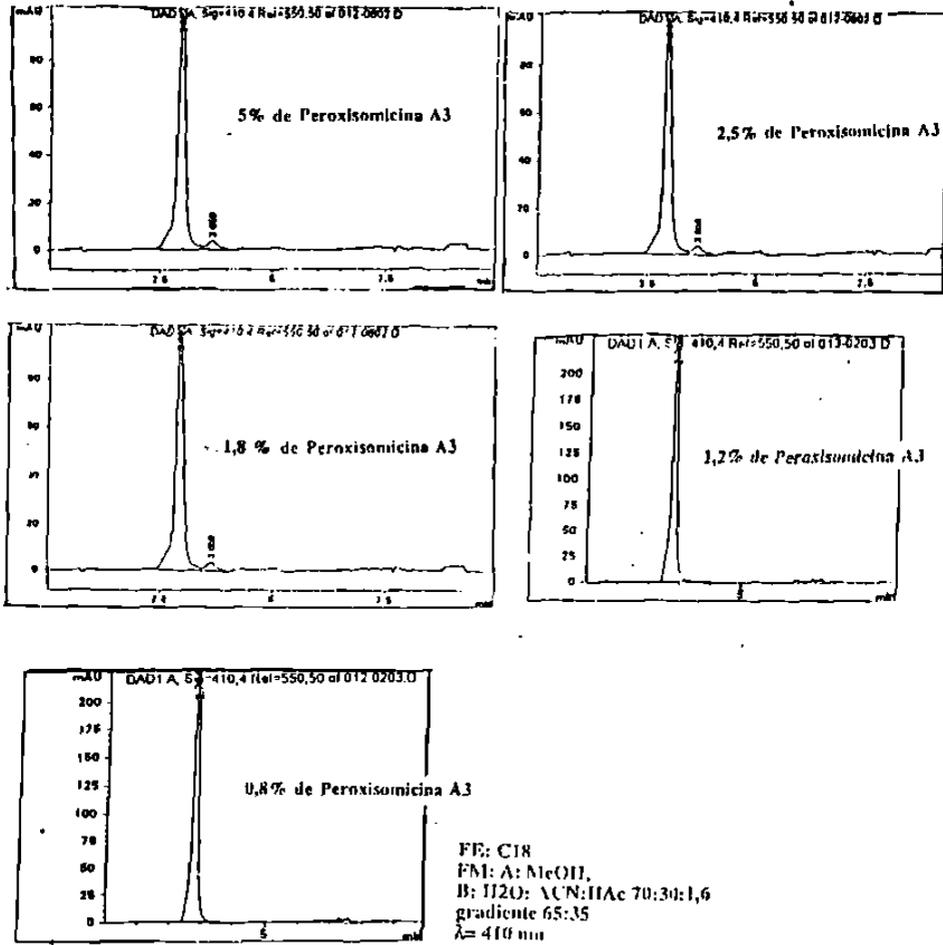


Fig. 18. Cromatogramas de las soluciones de Peroxisomicina A1 contaminadas con diferentes concentraciones % de Peroxisomicina A3.

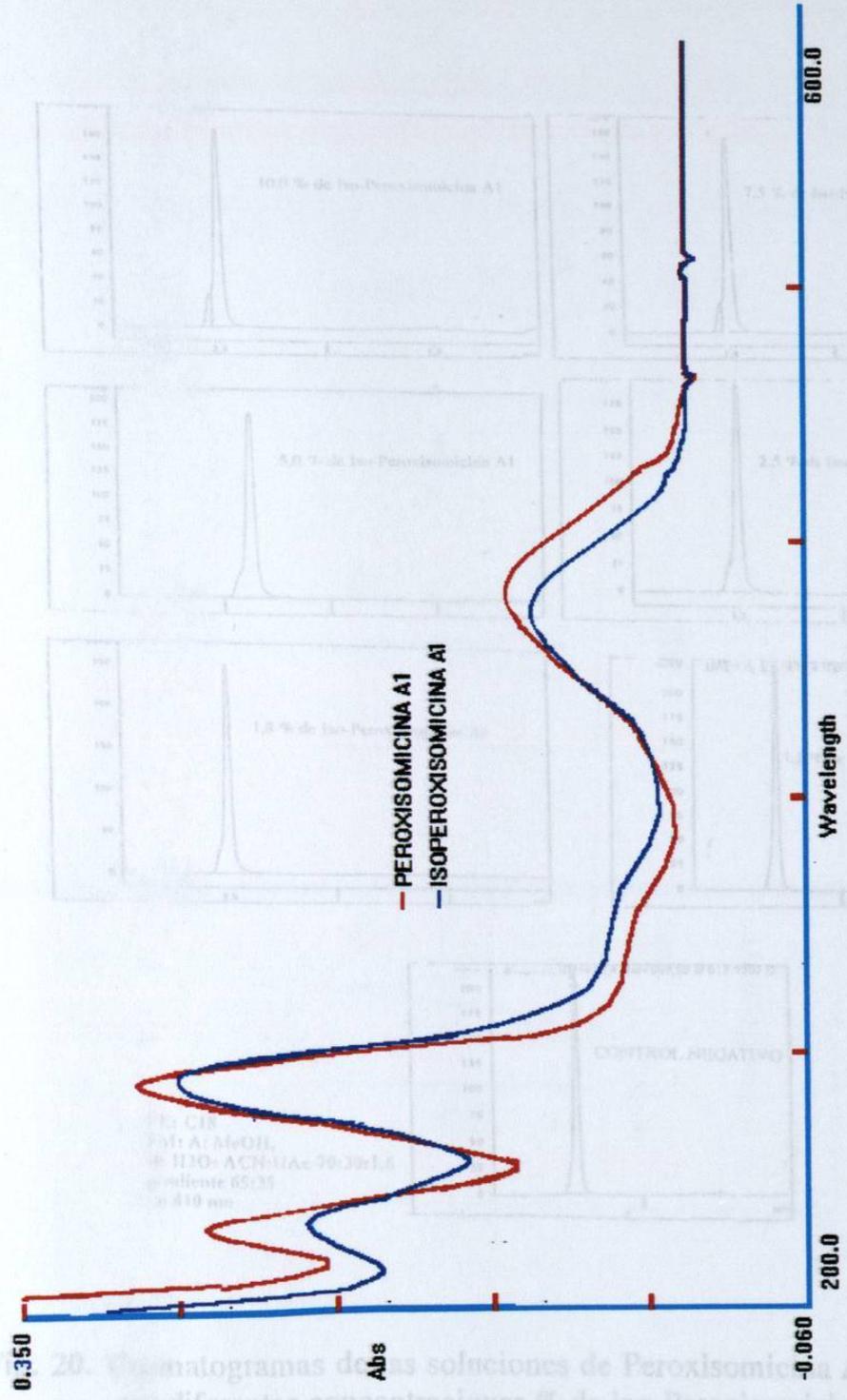


Fig. 19. Espectros UV-Vis de la Peroxisomicina A1 y la Iso-Peroxisomicina A1 sobrepuestos.

Fig. 20. Cromatogramas de las soluciones de Peroxisomicina A1 contaminadas con diferentes concentraciones % de iso-Peroxisomicina A1.

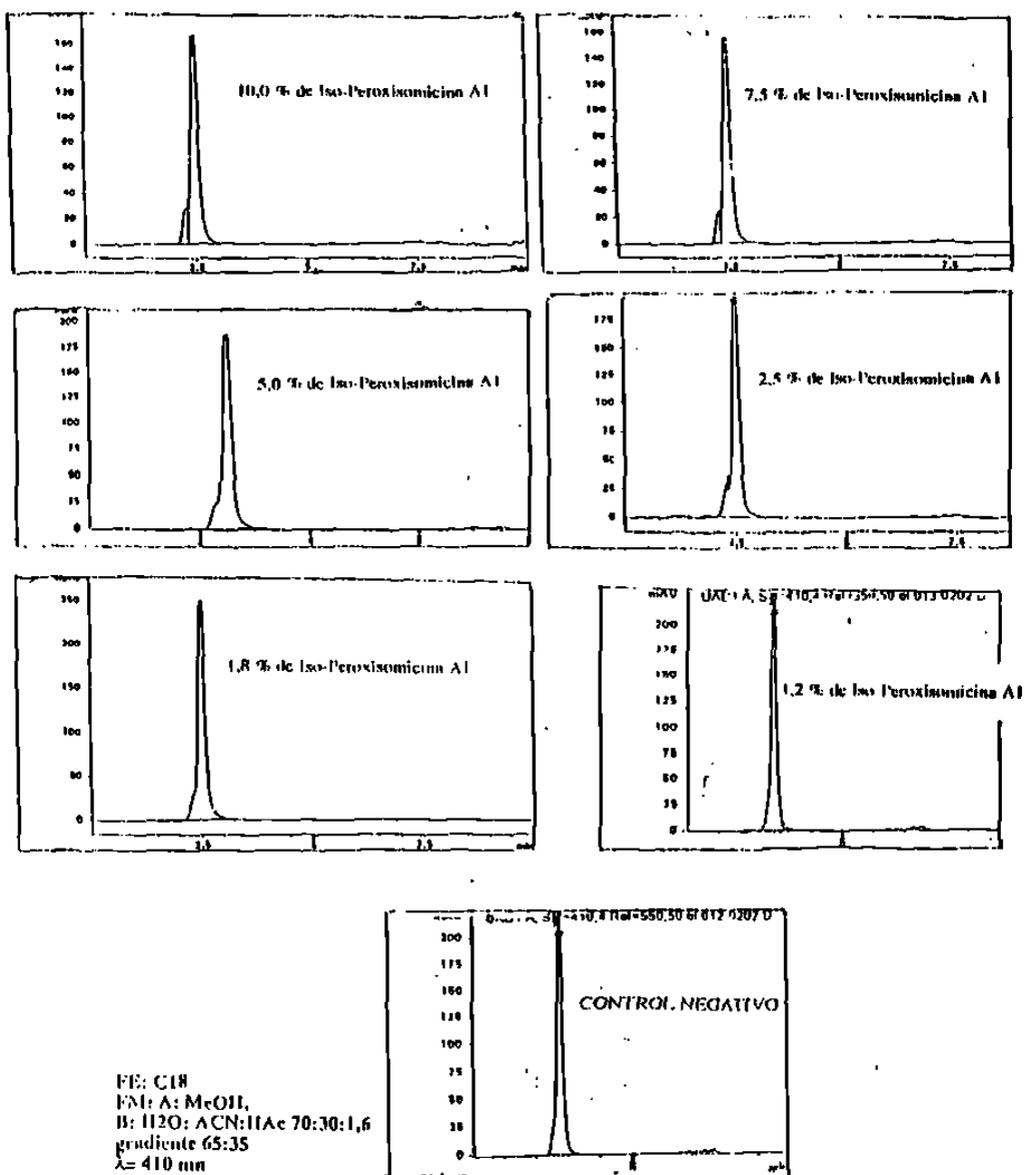


Fig. 20. Cromatogramas de las soluciones de Peroxisomicina A1 contaminadas con diferentes concentraciones % de Iso-Peroxisomicina A1.

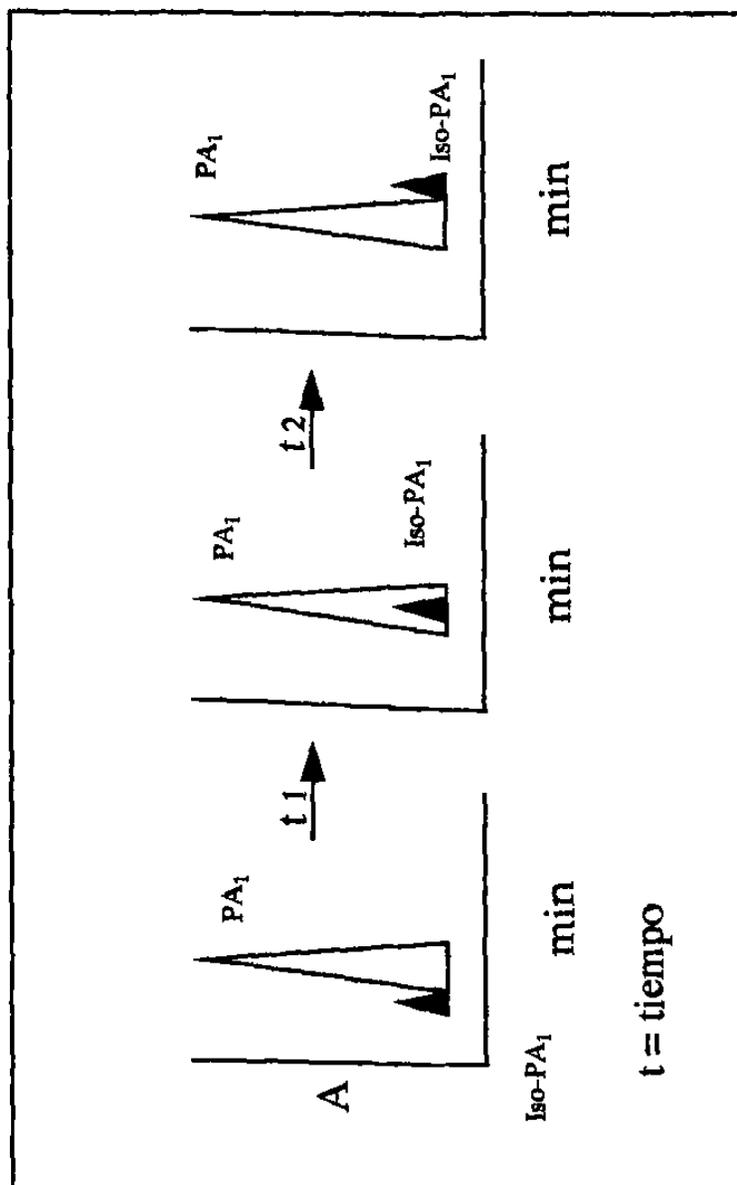


Fig. 21. Cambio del t_R de la Iso-Peroxisomicina A_1 respecto a la Peroxisomicina A_1 a través del tiempo de uso de la columna cromatográfica.



Fig. 22. Espectros UV-Vis de la Peroxisomicina A1 y la T516 sobrepuestos.

Fig. 23. Cromatograma de una muestra de la mezcla de las compuestos A1 y B1.

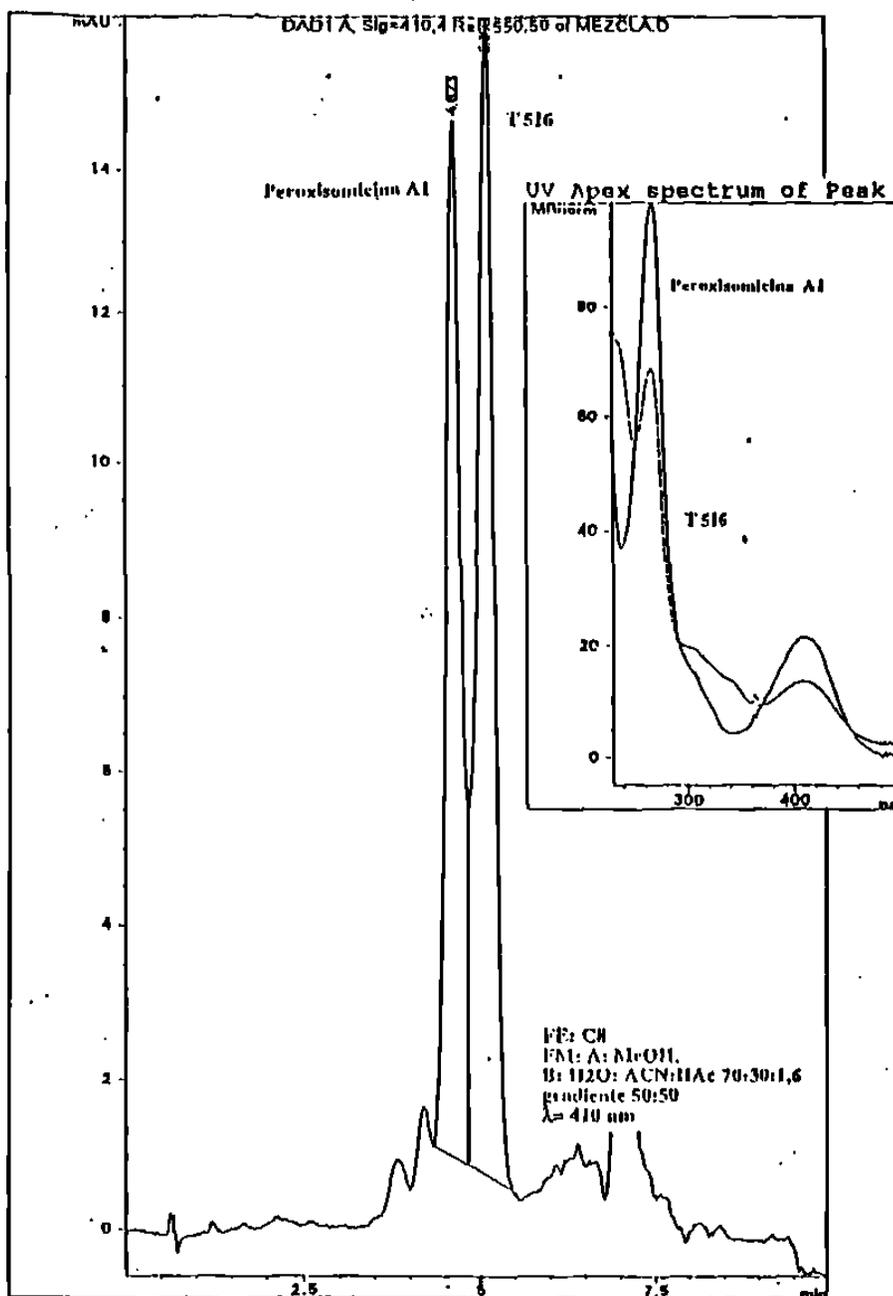


Fig. 23. Cromatograma de una mezcla de la Peroxisomicina A1 y la T516.

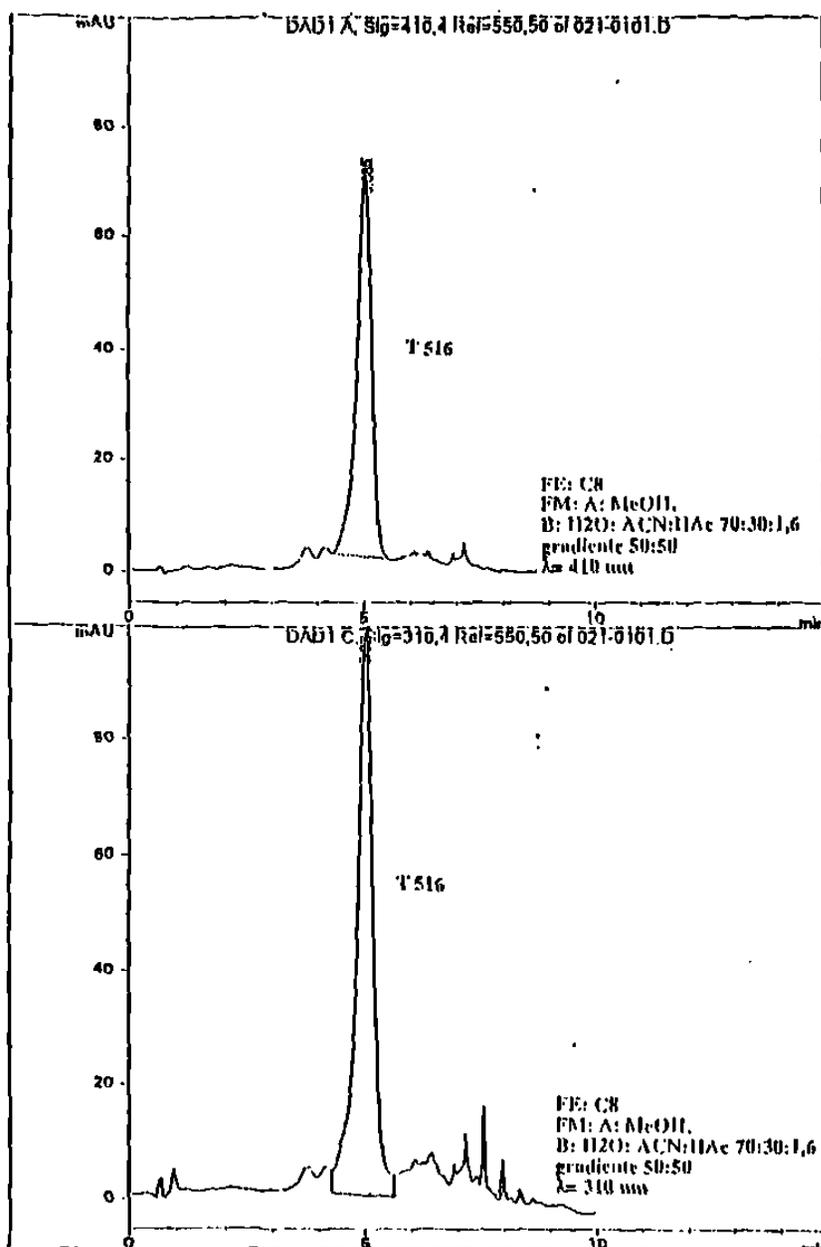


Fig. 24. Cromatograma de la T516 utilizando dos longitudes de onda de detección: 310 nm y 410

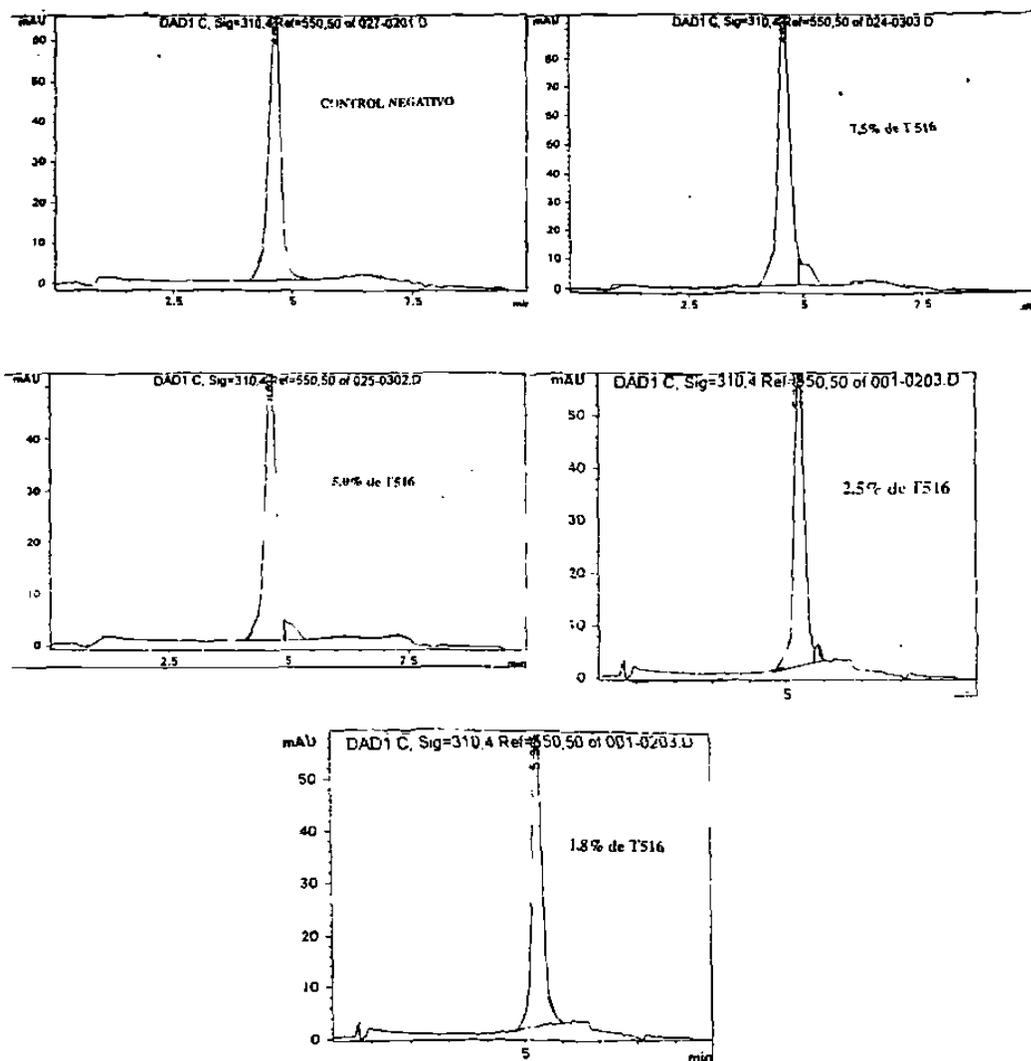


Fig. 25. Cromatogramas de las soluciones de Peroxisomicina A1 contaminadas con diferentes concentraciones % de T516.

APENDICE B

<i>Karwinskia</i>	Porcentaje		
	T514	T544	T496
<i>humboldtiana</i>	0.70	1.60	0.80
<i>mollis</i>	0.95	1.33	1.08
<i>umbellata</i>	0.05	0.75	0.50
<i>subcordata</i>	1.07	1.51	0.98
<i>latifolia</i>	0.50	--	1.10
<i>parvifolia</i>	1.02	--	1.58
<i>calderoni</i>	0.70	0.75	2.00
<i>rzedowski</i>	--	--	1.60
<i>ventervensii</i>	--	--	0.11
<i>tehuacana</i>	0.33	0.83	0.40
<i>johnstonii</i>	--	2.10	0.70

-- No detectado

Waksman y cols., 1989

Tabla No. 1. Porcentaje de toxinas en diferentes especies del género *Karwinskia* que existen en el país.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	% de actividad (3.9 μM)
Peroxisomicina A ₁	3.34 ± 0.99	45.29 ± 1.38
Peroxisomicina A ₂	3.64 ± 1.10	48.06 ± 1.38
Flegmacina A ₁	6.33 ± 2.79	62.05 ± 1.64
Flegmacina A ₂	8.54 ± 3.23	64.62 ± 1.59
T544	40.08 ± 1.57	100.00
T496	99.50 ± 19.03	100.00
T510	120.00 ± 10.44	100.00
Aminotriazol	4 x 10 ⁵	100.00

Moreno y cols., 1995.

Tabla No. 2. Efecto inhibitorio (CI₅₀) de compuestos antracénicos sobre la Actividad de Catalasa y el porcentaje de actividad de la enzima a una concentración constante de estos compuestos.

PRUEBA DEL CC CONTAMINANTE	UV-Vis $A_{\lambda_1} / A_{\lambda_2}$	CLAR-FR	% INHIBICION CATALASA
Peroxisomicina A ₃	----	1,80	----
Iso-Peroxisomicina A ₁	1,25 (280nm/ 437nm)	1,80	1,80
T 516	5,00 (430nm/415nm)	2,50	2,50
	0,80 (270nm/222nm)	----	----
	0,80 (270nm/415nm)	----	----
CC: Control de Calidad --: No detectado			

Tabla No. 3. Límites de Detección (% p/p) de las Pruebas del Control de Calidad de la Peroxisomicina A₁.

Lote No. 97-4-12 de Peroxisomicina A₁

Obtenido del fruto de: *K. parvifolia*

Lugar y fecha de colecta: Bajosori, Sin. 10'93

Fecha de obtención: 12-04'97

Cantidad: 12 g

Contiene:

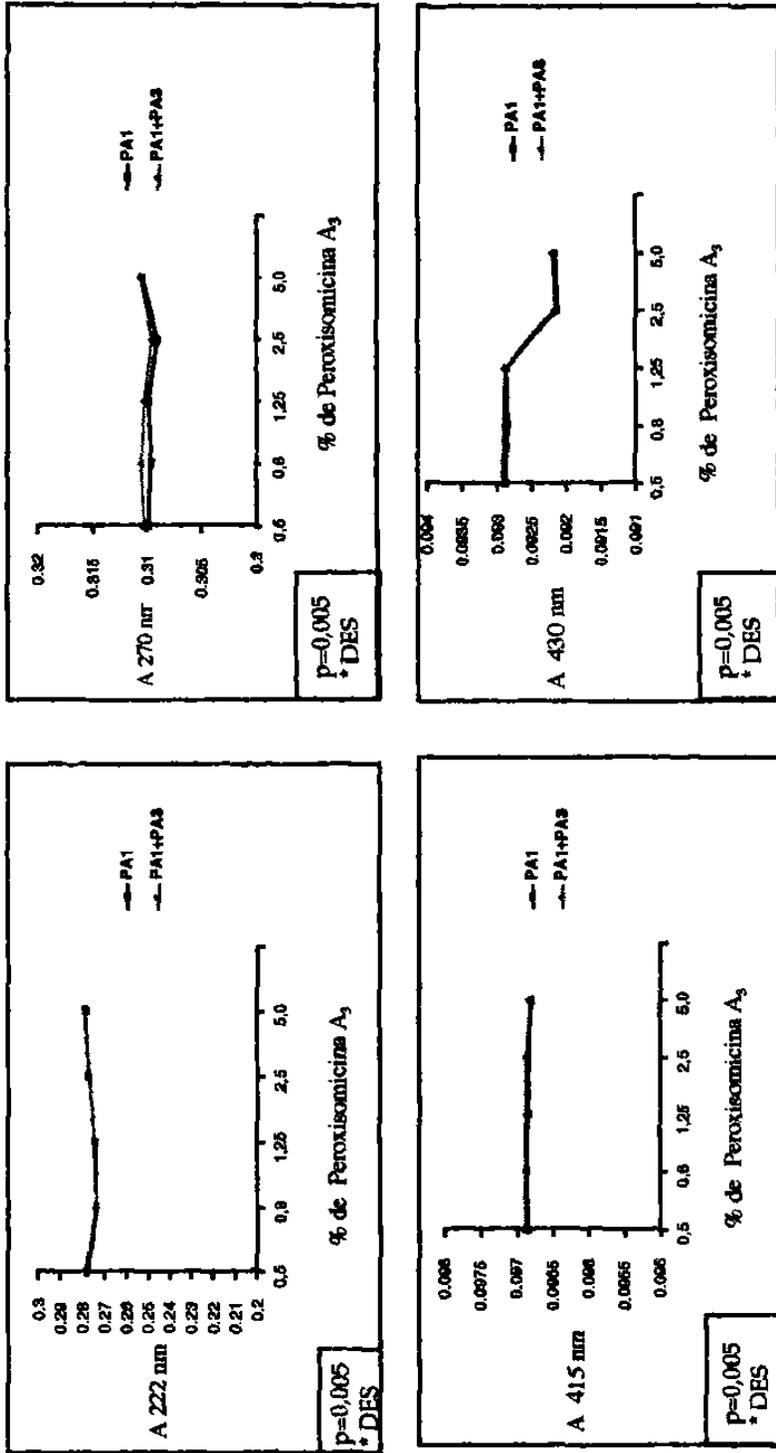
< 1,80 % p/p de Peroxisomicina A₃

< 1,25 % p/p de Iso-Peroxisomicina A₁

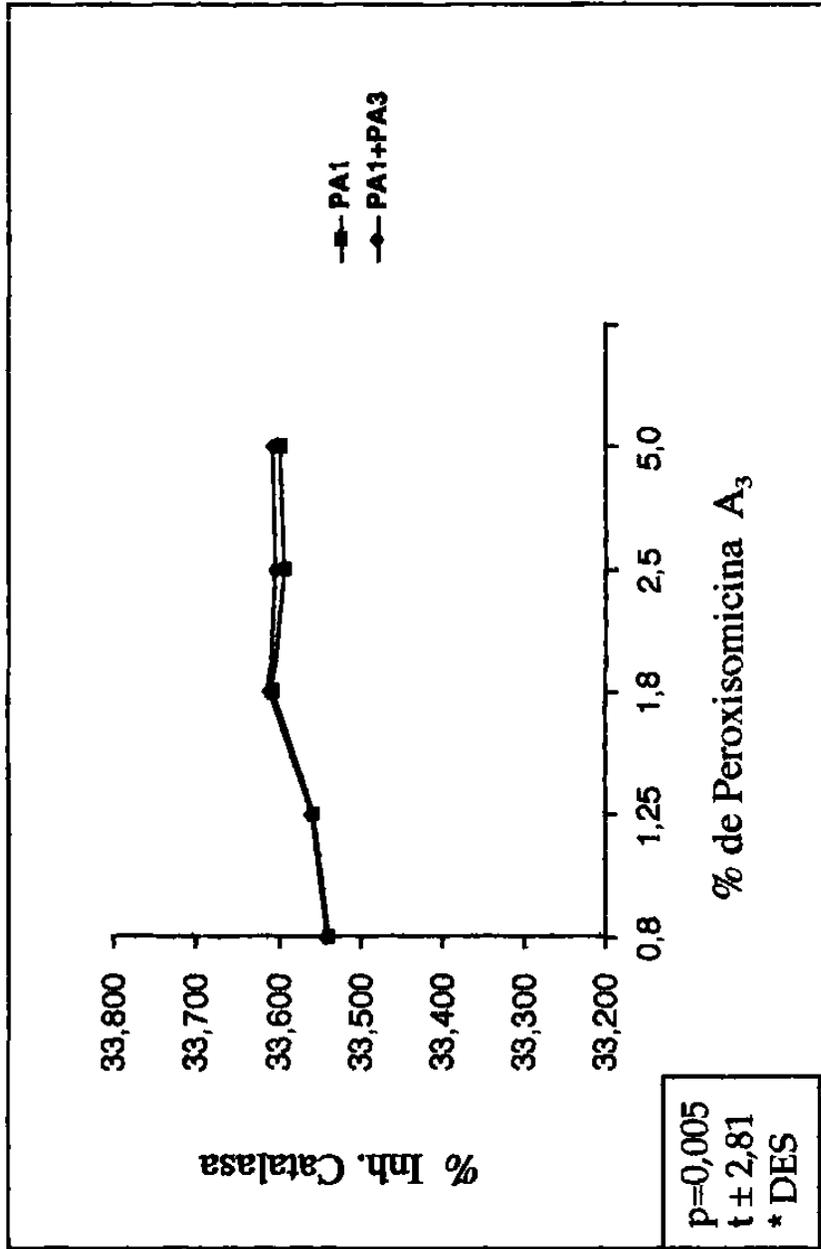
< 0,80 % p/p de T516.

Tabla No. 4. Diseño sugerido de la etiqueta para anexar a los Lotes de Peroxisomicina A₁ producidos.

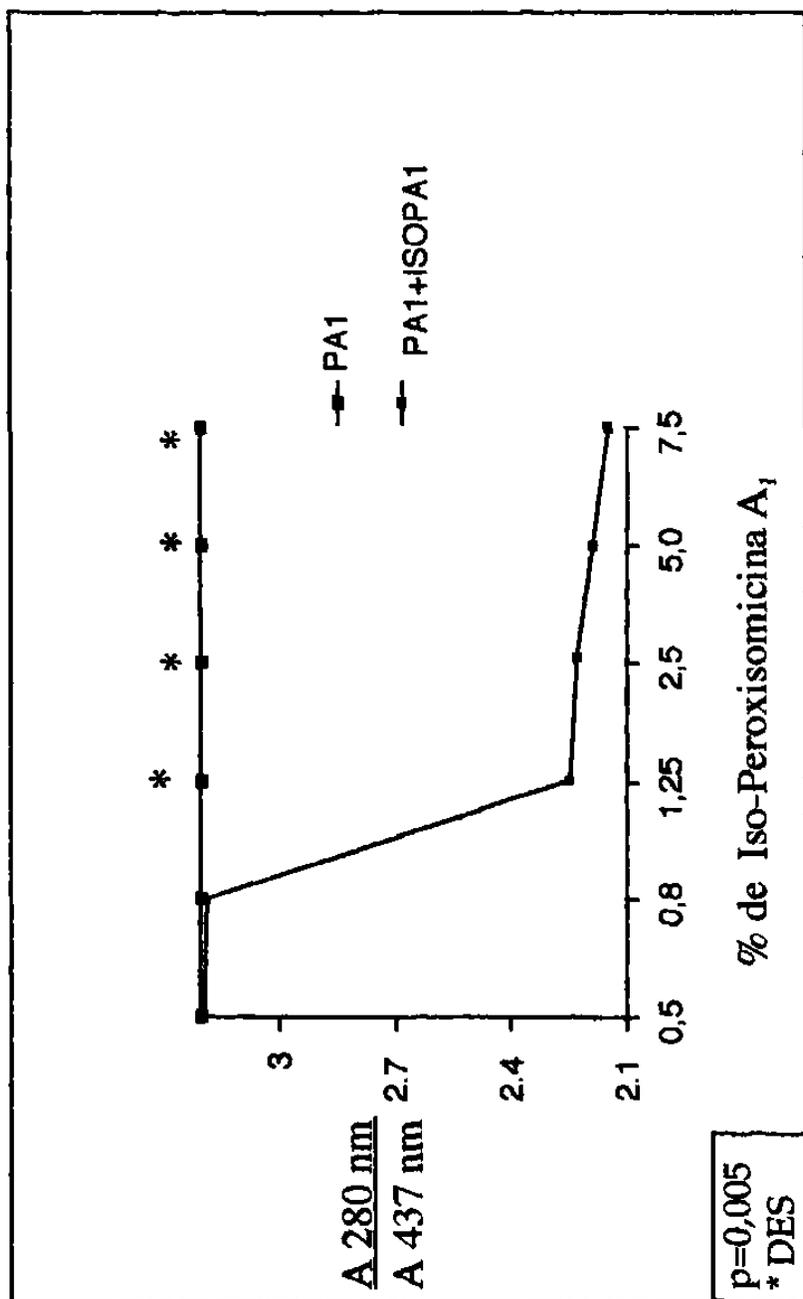
APENDICE C



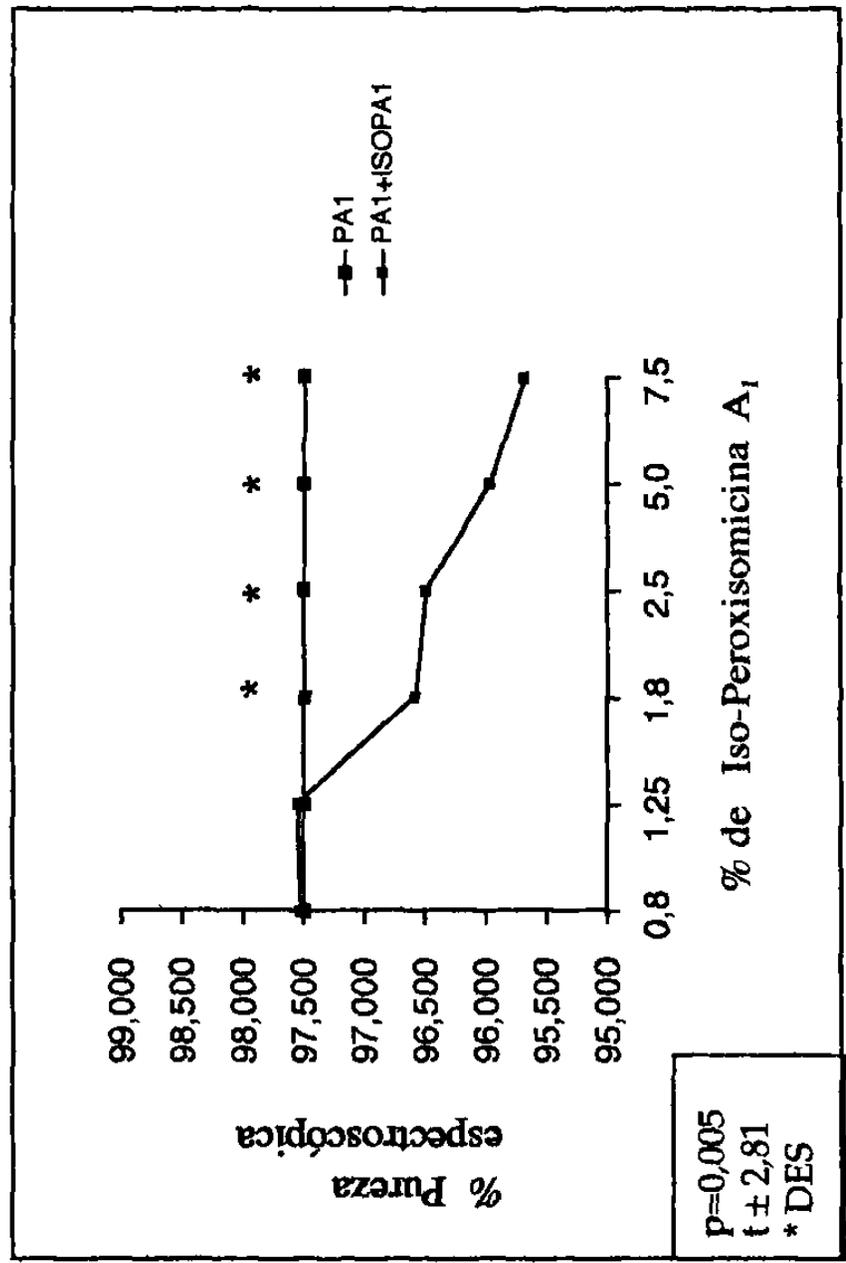
Gráfica No. 1. Comparación de las Absorbancias de las soluciones de Peroxisomicina A₁ respecto con contaminadas con diferentes concentraciones % de Peroxisomicina A₃ vs Peroxisomicina A₁ sin contaminar (control negativo).



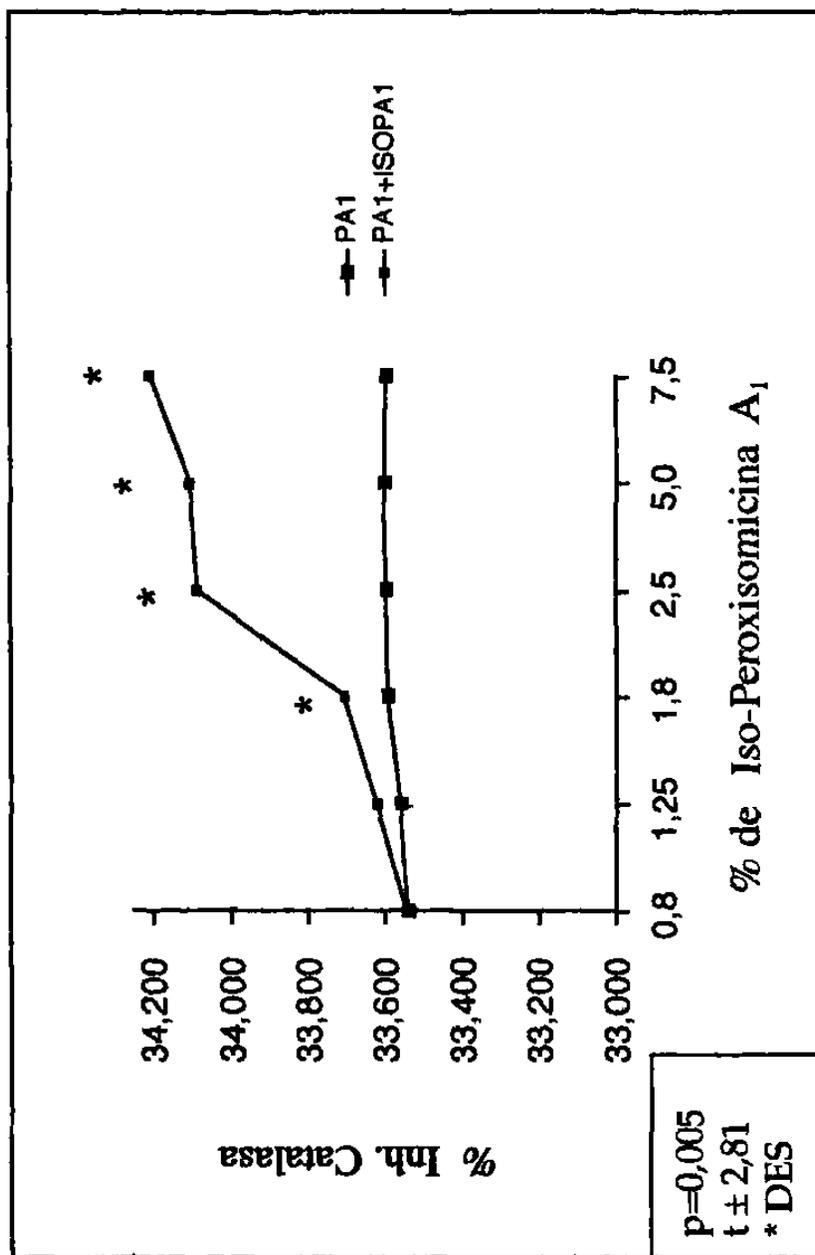
Gráfica No. 2. Comparación de la Inhibición de la Catalasa por soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de Peroxisomicina A₃ vs Peroxisomicina A₁ sin contaminar (control negativo).



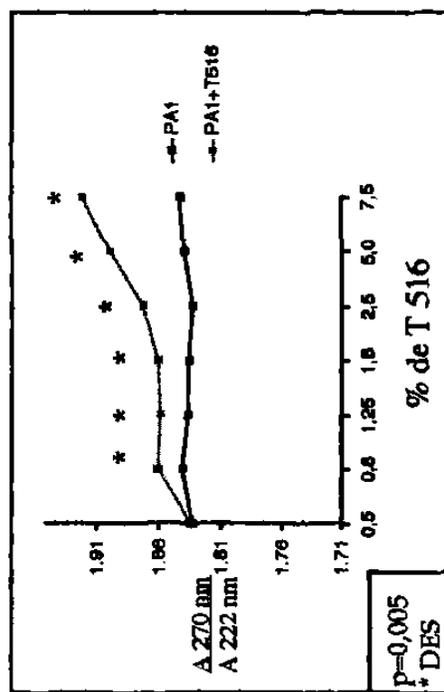
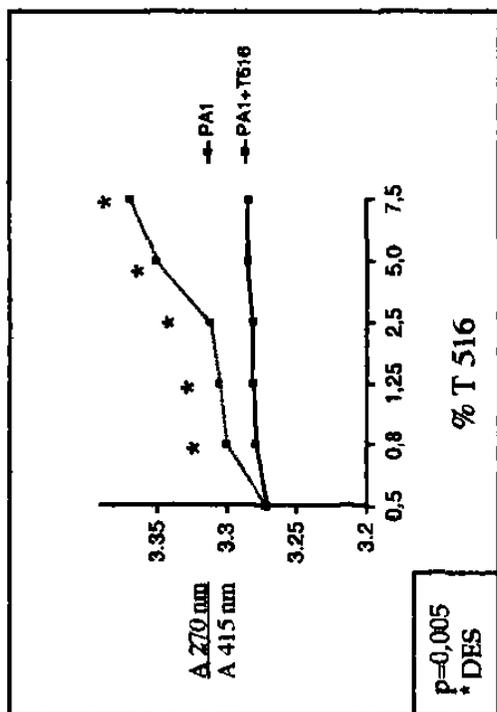
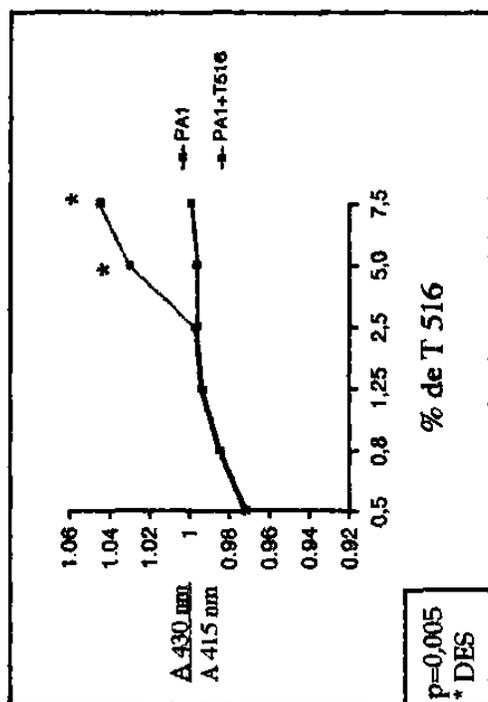
Gráfica No. 3. Comparación de la Relación de Absorbancias a 280nm/437 nm de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de Iso-Peroxisomicina A₁ vs Peroxisomicina A₁ sin contaminar (control negativo).



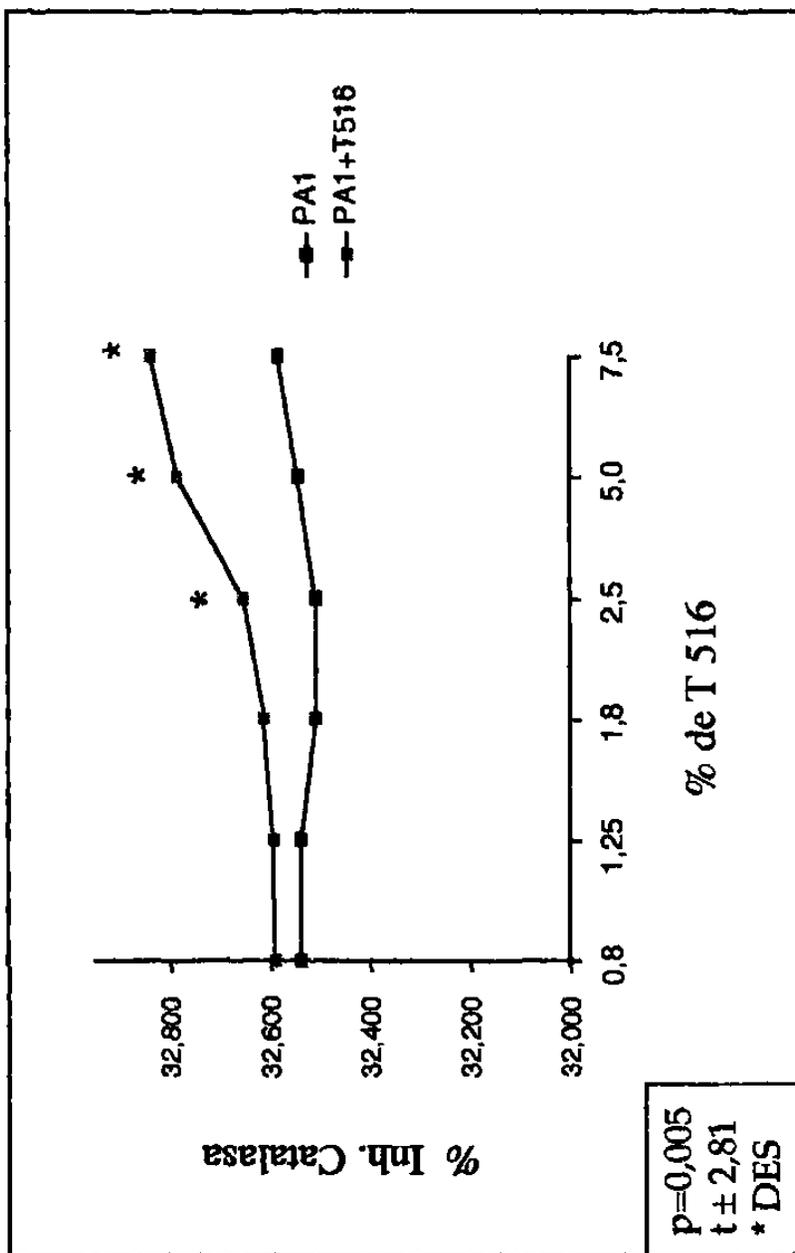
Gráfica No. 4. Comparación de la Pureza Espectroscópica de las soluciones de Peroxisomina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de Iso-Peroxisomina A₁ vs Peroxisomina A₁ sin contaminar (control negativo).



Gráfica No. 5. Comparación de la Inhibición de la Catalasa por soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de Iso-Peroxisomicina A₁ vs Peroxisomicina A₁ sin contaminar (control negativo).



Gráfica No. 6. Comparación de las Relaciones de Absorbancias de las soluciones de Peroxisomicina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de T516 vs Peroxisomicina A₁ sin contaminar (control negativo).



Gráfica No. 7. Comparación de la Inhibición de la Catalasa por soluciones de Peroxisomina A₁ contaminadas con diferentes concentraciones % de T516 vs Peroxisomina A₁ sin contaminar (control negativo).

